VISIT…

LANZAROTE Caliente.COM

АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

КЛАССИКИ НАУКИ



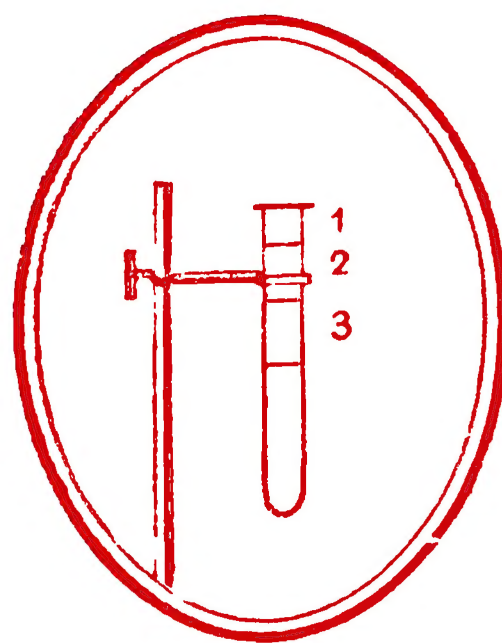
M. S. TSWETT

CHROMATOGRAPHIC ADSORPTION ANALYSIS



SELECTED PAPERS

EDITED BY A. A. RICHTER
AND T. A. KRASNOSSELSKAJA



ACADEMY OF SCIENCES OF THE USSR PRESS
MCMXLVI

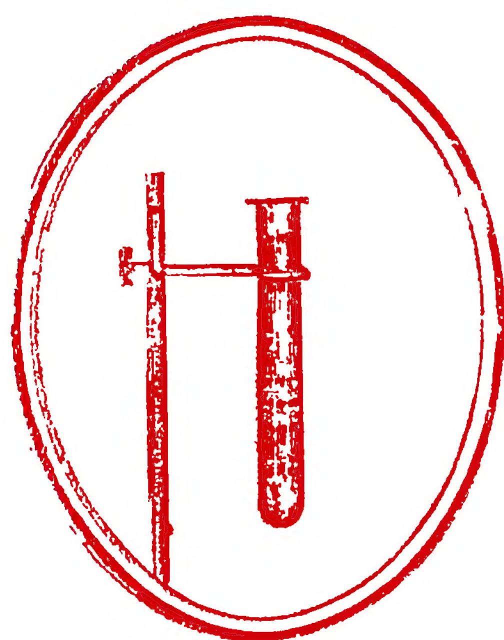
М. С. ЦВЕТ

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АДСОРБЦИОННЫЙ АНАЛИЗ



ИЗБРАННЫЕ РАБОТЫ

РЕДАКЦИЯ АКАДЕМИКА А. А. РИХТЕРА
И ПРОФЕССОРА Т. А. КРАСНОСЕЛЬСКОЙ



ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
1946

Под общей редакцией Комиссии Академии Наук СССР
по изданию научно-популярной литературы
Председатель Комиссии президент Академии Наук СССР
академик *С. И. ВАВИЛОВ*
Зам. председателя член-корреспондент Академии Наук СССР
П. Ф. ЮДИН

РЕДАКТОР ИЗДАНИЯ
А. Е. ГАЙСИНОВИЧ


ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
М.С. ЦВЕТ

М. С. ЦВЕТ

ИЗБРАННЫЕ РАБОТЫ



О НОВОЙ КАТЕГОРИИ АДСОРБЦИОННЫХ ЯВЛЕНИЙ И О ПРИМЕНЕНИИ ИХ К БИОХИМИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ

Предварительное сообщение

Сообщено в Биологическом отделении Варшавского Общества естество-испытателей 8/21 марта 1903 г.)[1]



ВВЕДЕНИЕ

Под названием *адсорбции* соединяются в настоящее время явления отчасти в своей сущности, может быть, разнородные, но отвечающие следуюцему общему определению: сгущение на поверхности тел окружающих их газов, паров, жидкостей или растворенных в последних веществ.

Поглощение животным и древесным углем не только красящих веществ, по общераспространенному мнению, но и вообще всевозможных растворенных веществ, а также газов; поглотительная способность почвы, огромная поглотительная способность для газов палладиевой и платиновой черни; сгущение водяных паров и газов на стеклянных и

[1] Труды Варшавского Общества естествоиспытателей, отд. биологии, т. 14, стр. 20—39, 1903.

металлических поверхностях (образование так называемых Wasserhaut или Lufthaut); поглощение водяных паров мелкопорошкообразными и коллоидальными металлическими окислами; поглощение воды гидрогелем кремнистого ангидрида; поглощение солей целлюлозой и животными перепонками; имбибиционные свойства целлюлозы, крахмала и пр.; поглощение красящих веществ растительными и животными волокнами (красильная техника), а также окраски гистологической техники — все это явления, которые если не целиком, то отчасти относятся к категории адсорбционных.

Что касается ближайшей природы адсорбции, то она еще далеко не выяснена, и наличный экспериментальный материал лишь в редких случаях позволяет выбрать между существующими различными физическими и химическими теориями, стремящимися объяснить часть или совокупность выше названных явлений, которые в будущем, без сомнения, получат каждая свою особую сферу приложения.

Адсорбционное поглощение растворенных веществ было до сих пор изучено преимущественно в водных растворах.[1] Если исключить некоторые опыты из области красильной техники, где применяются и спиртовые растворы пигментов, а также несколько наблюдений об обесцвечивающем действии угля не только на водные, но и на органические растворы, адсорбция из органических растворителей является terra incognita. Между тем на исследование адсорбции из органической среды можно возлагать некоторые надежды. Возьмем, например, такие индифферентные растворители, как эфир, хлороформ, сероуглерод, углеводороды серии бензола и, главным образом, нефтяные углеводороды (бензин, петролейный эфир, лигроин). Более или менее совершенная химическая инертность этих жидкостей, слабость их электродиссоциационного воздействия на растворенные в них соединения, и нерастворимость в них большинства неорганических и множе-

[1] Обзор литературы найдет место в полном моем труде.

ства органических веществ (позволяющая исследовать на одно и то же вещество адсорбционное действие многочисленных адсорбентов)[1], — все это особенности, для изучения вопроса методологически ценные.

Настоящая работа имела исходной точкой опыты, произведенные мною несколько лет тому назад[2], относительно вопроса о причинах нерастворимости хлорофилла из листьев в бензине или лигроине. Хлорофиллом, как известно, называют и должно исключительно называть ту группу растворимых в спирту пигментов, совокупность которых придает растительности ее специфическую окраску. В этом зеленом комплексе имеется не менее пяти различных пигментов, которые удобно разделить на две группы: *хлорофиллины* (хлорофиллин α и хлорофиллин β), обладающие красной флюоресценцией и полосами поглощения в обеих половинах спектра, и *ксантофиллины*[3] (каротин, ксантофилл α и

[1] Ср. Nernst. Zeitschr. f. physik. Chemie *13* (1894), p. 531.

[2] Физико-химическое строение хлорофильного зерна. Труды Казанского общ. естеств., т. XXV, 1901.

[3] В цитированной моей работе я принимал существование лишь двух ксантофиллинов: *каротина и хризофилла.* Но в этом пункте, как и относительно двойственности хлорофиллинов, дальнейшие исследования привели меня к полному подтверждению наблюдений Сорби (On Vegetable Chromatology. Proceed. Roy. Soc. London, *23*, 1873). Хризофилл (= ксантофилл Крауса и Монтеверде) оказался смесью двух пигментов, различающихся между прочим по относительному положению своих полос поглощения, которые я предлагаю называть ксантофиллами α и β, обозначая буквой α тот, полосы поглощения которого лежат левее, ближе к красной части спектра. Кстати о работе Сорби. Автору этого замечательного труда, оставшегося непризнанным и забытым в течение почти трех десятилетий, следовало бы хоть теперь отдать справедливость. В виду появления кое-где в новейшей литературе совершенно ошибочных отзывов относительно оценки работ Мархлевского и Шёнка младшего, считаю нужным напомнить, что Сорби в семидесятых годах совершенно корректно доказал и двойственность хлорофиллинов и тройственность ксантофиллинов, и заслуги названных новейших авторов сводятся к более или менее удачному *повторению* опытов Сорби.

ксантофилл β), желтые, не флюоресцирующие пигменты, имеющие полосы поглощения только в правой части спектра.

Все эти различные пигменты, раз они извлечены из тканей посредством спирта (а тоже ацетона или эфира), могут быть распознаваемы и до некоторой степени отделены друг от друга путем дифференциального растворения в двуфазных системах, вроде: лигроин + спирт + вода, или: сероуглерод + + спирт + вода (прием, введенный в изучение хлорофилла Стоксом, Сорби и Краусом), и все они оказываются вполне растворимыми в бензине и лигроине.

Между тем уже давно подмечено в литературе, что только что названные растворители извлекают из свежих или сухих листьев лишь следы „зеленого вещества" (т. е. хлорофиллинов) и получаемый раствор представляет более или менее интенсивно желтую окраску, обусловленную, согласно исследованиям Арно, каротином.

Чем же обусловливается эта „нерастворяемость" большинства хлорофильных пигментов? Явление объяснялось различно и противоречиво. Некоторые авторы ссылались на мнимую недоступность пигментов для растворителя. Другие принимали, что остающийся в ткани пигмент (предполагалось, что тут имеется только один пигмент) просто нерастворим в лигроине, и что, если будучи извлечен из листьев спиртом, он и растворяется в вышеназванном растворителе, то отсюда следует, что он уже изменился. Так, между прочим, Монтеверде, занимавшийся зелеными кристаллами, открытыми Бородиным, нерастворимыми в лигроине, усматривал в этих кристаллах настоящее неизмененное зеленое начало хлорофилла[1].

Экспериментальное расследование вопроса привело меня к следующему результату. Нерастворяемость большей части хлорофилловых пигментов из листьев в бензине и лигроине

[1] M o n t e v e r d e. Das Absorptionsspectrum des Chlorophylls. Acta Horti Petropolitani, *13*, (1893), p. 123.

обусловливается не их нерастворимостью в этих жидкостях, а задерживающим действием молекулярных сил субстрата, т. е. адсорбционным поглощением. Растворительная энергия лигроина по отношению к данным пигментам превышается адсорбционной силой субстрата, но последняя преодолевается иными растворителями, вроде спирта, а потому прибавление даже небольшой доли (1/100) абсолютного спирта к лигроину вызывает немедленное извлечение всех пигментов. В доказательство правильности этого толкования, я привел следующего рода опыты. Извлеченный из листьев хлорофилл, нацело растворимый в лигроине, путем выпаривания раствора в безвоздушном пространстве в присутствии фильтровальной бумаги, внедряется в последнюю. Окрашенная таким образом хлорофиллом бумага относится к растворителям точь в точь как первоначальный зеленый лист. Лигроин извлекает из нее только каротин, а остальные пигменты освобождаются под условием прибавления следов спирта. Экспериментатор может, по своему желанию, переводить хлорофилл из „растворимого" в „нерастворимый" вид и наоборот, не посягая при этом на химическую неприкосновенность пигментов, как это доказывает спектроскопический контроль. Так как существование какого-нибудь химического сродства между целлюлозой фильтровальной бумаги и хлорофильными пигментами в высшей степени невероятно, то мы имеем, значит, дело с типичным явлением адсорбции.

Позднейшие опыты показали (как следовало ожидать), что бумага, погруженная в лигроиновый раствор хлорофилла, сама улавливает подлежащие ее адсорбционной деятельности пигменты и зеленеет.

Следовало ожидать тоже, что всевозможные порошкообразные вещества окажут адсорбционное действие на хлорофилловые пигменты в лигроиновых растворах, и возникала надежда, что систематическое изучение вопроса бросит некоторый свет на сущность адсорбционных явлений и позво-

лит выработать на их основании новый метод физического отделения веществ. Соображения эти побудили меня предпринять обширный ряд опытов, главнейшие наличные результаты которых вкратце излагаются ниже.

АДСОРБЦИЯ ХЛОРОФИЛЛОВЫХ ПИГМЕНТОВ ИЗ ЛИГРОИНОВЫХ РАСТВОРОВ

Приготовление растворов

Нерастворяемость хлорофилловых пигментов в лигроине и бензине является более или менее совершенной лишь в сухих листьях (высушенных при низкой температуре). Из свежих же листьев, при тщательном растирании их в присутствии растворителя, извлекаются хотя незначительные, но все-таки заметные количества хлорофиллинов и ксантофилла α, гораздо более, чем принято и чем я сам находил в прежних своих исследованиях.

Дело в том, что, не считаясь со способностью порошкообразных веществ адсорбировать растворенные в лигроине тела, я растирал зеленые листья не только с примесью кварцевого песка или наждака, но с прибавлением (ввиду нейтрализации сока) значительных количеств порошкообразных окиси магния или углекислой извести, и таким образом задерживал часть перешедших уже в раствор пигментов. Последующая фильтрация через бумагу в свою очередь содействовала удалению оставшихся в растворе адсорбируемых ею пигментов, и таким образом из свежих листьев получался почти чистый раствор каротина, как и из сухих. На самом же деле, если исключить это побочное действие, оказывается, что адсорбционное задержание пигментов гораздо менее значительно в свежих, чем в сухих листьях.

Растирая листья с примесью минимального количества толченого стекла и нейтрализатора, получаемый в таких условиях лигроиновый экстракт лишь в редких случаях представляет чистожелтую окраску и спектр поглощения чистого каротина, обыкновенно же обладает заметным зеленоватым оттенком и соответствующими присутствию хлорофиллинов и ксантофилла α спектральными свойствами. Особенно богатыми хлорофиллинами являются лигроиновые экстракты листьев тисса (Taxus baccata).

Под влиянием этих фактов у меня явилось предположение, что зеленая окраска происходит тут не от растворенных веществ, а от взвешенных, взмученных вследствие растирания ткани мельчайших осколков хлоропластов. Предположение это находило видимое подтверждение в том обстоятельстве, что слабо флюоресцирующий раствор являлся мутноватым, опалесцирующим и что при фильтрации зеленая окраска удерживалась фильтром.

Для разрешения вопроса были произведены следующие опыты. Из обыкновенных пробирок, нижняя часть которых вытягивалась в пламени бунзеновской горелки в узкую шейку (в 1 мм диаметра), были изготовлены особые воронки, на кончик которых привязывался колпачок из шведской бумаги. Жидкость, пропущенная через такой прибор с минимальной фильтрующей поверхностью, должна была, в случае если бы ее зеленая окраска была обусловлена взвешенными частицами, еще лучше очиститься от нее, чем при фильтрации на обыкновенном фильтре. Если же, наоборот, зеленая окраска происходила от растворенных веществ, то она должна была сохраниться с почти неослабленной интенсивностью в фильтрате, так как для адсорбционного насыщения фильтрующей поверхности требовалось лишь ничтожное количество пигментов.

На самом деле оправдался второй случай. Фильтрат сохранял свой зеленоватый оттенок; исследованный с помощью

моего флюороскопа[1], он оказывался совершенно прозрачным (без опалесценции) и представлял яркую красную флюоресценцию.

Но если, следовательно, чистый лигроин (или бензин) способен извлекать из свежих листьев заметные количества хлорофиллинов, то все же такие экстракты сравнительно бедны пигментами и для адсорбционных экспериментов более пригодны приготовленные по следующим способам растворы.

1) Свежие листья (я пользовался обыкновенно листьями Lamium album и Plantago media) быстро растираются в ступке с примесью толченого стекла и (для удаления кислот) окиси магния или углекислого кальция. Растирание продолжается затем под слоем ацетона, и получаемый чрезвычайно густой раствор хлорофилла пропускается через двойной бумажный фильтр или, еще лучше, через плотный тампон асбеста, под отрицательным давлением. Прозрачная (без всякой мути) жидкость выпаривается в безвоздушном пространстве при температуре 50—60°С, и сухой остаток растворяется в чистом лигроине. Полученный таким образом раствор содержит в себе, как показывает спектроскопическое исследование, неизмененные пигменты.

2) Листья растираются, как сказано выше, но извлечение происходит посредством лигроина с примесью одной десятой абсолютного спирта. После фильтрации зеленый раствор взбалтывается повторно с равным объемом воды, в которую переходит практически весь спирт, имеющийся в экстракте. Лигроиновый слой, который является обыкновенно более или менее мутноватым (от взвешенных капелек воды), пропускается через бумажный фильтр, причем получается совершенно прозрачный зеленый фильтрат.

---

[1] Zeitschr. für physik. Chemie. *36* (191), p. 450. — Физико-химическое строение хлорофильного зерна, p. 58.

Адсорбенты

В качестве адсорбентов было исследовано более сотни нижеперечисленных веществ, выбранных в разнообразных группах химической системы. Таким образом, можно было надеяться выдвинуть общее для материи вообще, независимо от того или иного строения молекул, адсорбционное действие, и попутно подметить возможные химические воздействия различных веществ на пигменты хлорофилла.

Большая часть примененных препаратов происходила от немецких фирм Кальбаума, Мерка, Шеринга, Грюблера, другие из местного завода Рутковского.

Простые тела: сера, кремний, магний, цинк, железо, свинец.

Окиси и гидраты окисей: окиси магния, железа, свинца, серебра, сурьмы, перекись марганца, гидрат окиси алюминия, едкий натр, едкий кальций, едкий барит, натристая известь.

Кислоты: борная, щавелевая, винная, дубильная, мочевая, пикриновая.

Соли хлористоводородной кислоты: соли натрия, калия, аммония, кальция, бария, магния, алюминия, железа, кобальта, меди, ртути.

Соли хлорной кислоты: соли калия и бария.

Соли бромистоводородной кислоты: соль калия.

Соли иодистоводородной кислоты: соль ртути.

Соли иодной кислоты: соль калия.

Соли сероводородной кислоты: соли калия и ртути.

Соли сернистой кислоты: одно- и двуосновная соль натрия.

Соли серной кислоты: соли калия, аммония, кальция, бария, магния, железа, марганца, меди, цинка, аммиачная сернокислая соль меди.

Соли азотной кислоты: соли калия, кальция, бария, меди, серебра, свинца, урана.

Соли фосфорной кислоты. одноосновная соль натрия, одно- и двуосновная соли калия, трехосновная соль аммония, соли кальция и железа.

Соли угольной кислоты: соли натрия, кальция, магния, железа и меди.

Соли кремневой кислоты. соль калия, асбест.

Соли молибденовой кислоты: соль аммония.

Соли органических кислот: уксуснокислые соли свинца и меди, щавелевокислые соли аммония и марганца. Сахарат окиси железа.

Цианистые соединения. железисто-синеродистый и железо-синеродистый калий.

Алдегиды: хлоралгидрат.

Амиды: аспарагин, мочевина.

Многоатомные спирты: маннит, дульцит.

Углеводы: сахароза, галактоза, инулин, крахмал, целлюлоза.

Производные бензола: резорцин, гидрохинон, пирогаллол, фенолфталеин.

Алкалоиды: хинин.

Альбуминоиды: овальбумин, пептон, гемоглобин (пепсин).

Varia. кармин, генцианафиолет, хризоидин, флюоресцин.

Вещества неопределенного состава: стеклянная вата, триппель, огородная земля, наждак, костяной и кровяной уголь.

Методика опытов

Опыты адсорбции производились трояким образом.

1) Адсорбент, превращенный в тонкий порошок путем тщательного растирания в совершенно сухо йступке, всыпался в узкогорлую воронку описанной в предпоследнем параграфе формы, на кончике которой, для задержания порошка, прикреплялся колпачок из фильтровальной бумаги. Порошок плотно и равномерно тассировался помощью стек-

лянной палочки, и затем в воронку или прямо наливался лигроиновый раствор хлорофилла, или же через порошок предварительно пропускался для вытеснения воздуха чистый лигроин. Фильтрация производилась под небольшим, положительным или отрицательным давлением.

2) Раствор хлорофилла наливался в пробирку, и затем туда же всыпался адсорбент. После энергичного встряхивания содержимое пробирки подвергалось центробежной силе, причем адсорбент скоплялся на дне, увлекая с собой поглощенные им пигменты. Или же наоборот: в пробирку сперва всыпался адсорбент, встряхивался предварительно с небольшим количеством чистого лигроина и затем уже приливался раствор хлорофилла.

3) При опытах с очень гигроскопическими, быстро расплывающимися на воздухе веществами, как, например, нитраты меди и кальция, хлористая медь и др., раствор хлорофилла вливался в ступку, сюда же прямо из банки всыпался адсорбент и тут уже под лигроиновым раствором растирался.

Результаты

Все испытанные вещества *без исключения* оказались способными адсорбировать часть или совокупность хлорофильных пигментов. В целях большей ясности и краткости я опишу сначала результаты опытов с инулином, являющиеся, так сказать, типичными, и затем приведу те отклонения, которые встречались при исследовании других адсорбентов.

Опыты с инулином. Кальбаумовский препарат, служивший в моих опытах, является в виде тонкого порошка, более или менее округленные крупинки которого обладают довольно различными диаметрами, колеблющимися приблизительно около величины 2μ. Принимая плотность инулина равной 1,35 и предполагая, что препарат состоит из шаро-

образных зернышек одинакового диаметра $= 2\mu$, простое исчисление показывает, что общая поверхность вещества для одного грамма порошка является равной 2,22 квадратным метрам.

При встряхивании хлорофиллового раствора с инулином в пробирке, часть пигментов немедленно поглощается, и оседающий на дне пробирки порошок является зеленым, между тем как просветляющаяся жидкость принимает тем более чистый желтый цвет, чем более было взято адсорбента. Если последний был взят в достаточном количестве, то в лигроине растворенным остается из пигментов только каротин, узнаваемый по своему спектру и по тому, что при взбалтывании его раствора с $85^0/_0$-ным спиртом пигмент остается практически целиком в лигроиновой фазе.

Осадившийся зеленый порошок взбалтывается повторно с чистым лигроином, для удаления последних оставшихся в нем по капиллярности следов каротина. Для освобождения пигментов из адсорбировавшего их порошка можно применять различные растворители: спирт, ацетон, эфир, хлороформ, лигроин с примесью спирта и отчасти сероуглерод. Последние два растворителя в чистом виде извлекают лишь часть пигментов, нацело же растворяют их только при прибавлении к ним спирта.

Наиболее удобно и рационально пользоваться для освобождения пигментов лигроином с примесью ($^1/_{10}$) спирта. Спектроскопическое исследование полученного зеленого раствора показывает, что пигменты не изменились. При взбалтывании раствора с $80^0/_0$-ным спиртом наблюдается нормальная „Краусовская реакция“. Спиртовая фаза, в которой преобладают ксантофиллы α и β, является яркожелтой, а лигроиновая, содержащая главным образом оба хлорофиллина, имеет сине-зеленый цвет. Пигменты можно вновь перевести в чисто лигроиновый раствор, откуда они вновь адсорбируются инулином или другими адсорбентами.

Особенно поучительно наблюдение адсорбционных явлений при фильтрации через порошок. Из нижнего конца воронки вытекает сначала бесцветная, потом желтая (каротин) жидкость, между тем как в поверхностных слоях инулинового столба образуется интенсивное зеленое кольцо, на нижнем краю которого скоро дифференцируется желтая кайма. При последующем пропускании через инулиновый столб чистого лигроина оба кольца, зеленое и желтое, значительно расширяются и распространяются вниз, до известного предела, чем доказывается, что и здесь (как в известных уже разных случаях адсорбции) количество адсорбированного вещества зависит от концентрации, от осмотического напряжения его в растворе, но не пропорционально ему, так как не сводится к нулю при осмотическом напряжении, равном нулю.

Если фильтрация производится через столб порошка, недостаточный для адсорбционного удержания всего красящего вещества, то желтое кольцо в своем нисходящем движении может достигнуть бумаги, закрывающей нижнее отверстие воронки, и тогда лигроин начинает опять вытекать желтым. Спектроскопическое исследование вытекающего лигроина показывает, что пигмент желтого кольца есть ксантофилл α.

В самой зеленой полосе тоже происходит дифференциация, а именно на сине-зеленую нижнюю и желто-зеленую верхнюю зоны.

Опыты с другими адсорбентами. Наблюдения, сделанные при опытах с инулином, точь-в-точь повторяются при экспериментах с углекислым кальцием, гидратом окиси алюминия, сахаром и многими другими адсорбентами. В других случаях встречаются *отступления* от вышеописанного.

Во-первых, много веществ поглощают, кроме хлорофиллинов и ксантофиллов α и β, еще и каротин. Таковы, между

прочими, безводные сульфаты меди, железа, магния, бария, окиси железа, серебра, свинца, перекись марганца, безводный хлористый кальций, костяной и кровяной угли. Впрочем, большинство этих веществ оказывает на каротин (как и на другие пигменты) разрушающее химическое действие. Исключительно физическое действие имеют, между прочими, окись свинца, окись серебра и хлористый кальций.

Во-вторых, многие адсорбенты химически изменяют поглощаемые ими пигменты. Так, едкие щелочи оказывают на хлорофиллины то же действие, что они имеют в растворенном виде. Другого рода изменение, претерпеваемое хлорофиллинами при адсорбции их многими веществами, можно назвать „кислотным", ибо названные пигменты претерпевают такие спектроскопические превращения, какие наблюдаются при воздействии минеральных и органических кислот на спиртовые вытяжки хлорофилла (возникновение спектра „хлорофиллана"). Сущность этих „кислотных" изменений еще совсем неизвестна, несмотря на многочисленные исследования над ними. По некоторым наведениям, в процессе, вероятно, участвует окислительный момент. В числе адсорбентов, действующих на хлорофиллины по „кислотному" типу, следует назвать все поименованные в списке кислоты, исключая борную, но прибавляя пирогаллол, резорцин, аспарагин (сукцинаминосуксиновая кислота) и фенолфталеин; затем все соли хлористоводородной кислоты, исключая соли щелочных металлов; все соли серной кислоты, за исключением аммиачной сернокислой меди, все соли азотной кислоты, за исключением баритовой, соли фосфорной кислоты, за исключением трехосновной аммиачной. Настоящее окислительное действие проявляет перекись марганца и железосинеродистый калий, разрушающие все пигменты хлорофилла.

Интересным обстоятельством является то, что некоторые из кислотно действующих солей, будучи совершенно лишены кристаллизационной воды путем сильного нагрева-

ния, становятся химически индифферентными по отношению к хлорофилловым пигментам. Таковы азотнокислая и хлористоводородная соли кальция.

Следует заметить здесь, что кислотно измененные хлорофиллины (по крайней мере, хлорофиллин α) значительно меньше адсорбируются, чем первоначальные пигменты, как это особенно ясно видно в опытах фильтрации, где при дифференциации цветных полос наблюдаются соответственные отклонения от описанной в начале нормы. О них будет более подробная речь в моем полном мемуаре.

Особого упомяновения заслуживают испробованные мною препараты животного угля. Оба являются энергичнейшими адсорбентами совокупности хлорофилловых пигментов. Особенно отличается костяной уголь, из которого не только лигроин с примесью спирта, но даже чистый спирт не извлекал поглощенных пигментов. Эта огромная поглотительная способность угля должна объясняться, как это делал уже Квинке[1], величайшей пористостью этого вещества, представляющего такую степень раздробления материи, которая едва ли достижима механическим путем.

АДСОРБЦИЯ ХЛОРОФИЛЛОВЫХ ПИГМЕНТОВ ИЗ БЕНЗОЛЬНЫХ И СЕРОУГЛЕРОДНЫХ РАСТВОРОВ

Между тем как бензин и лигроин извлекают из свежих листьев незначительные количества хлорофиллинов и ксантофиллов, бензол, а также сероуглерод переводят в раствор совокупность пигментов. Правда, и здесь получаемые в первых вытяжках пигменты далеко не фигурируют в тех относительных пропорциях, в которых они содержатся в хлорофильных зернах, так как преобладают каротин и

---

[1] Quincke. Pogg. Ann. *18*, (1859), p. 336.

ксантофилл α. Но в конце концов, путем повторных извлечений, удается удалить из тканей совокупность пигментов. Факт этот, впрочем, можно было предвидеть на основании прежних моих микроскопических наблюдений (loc. cit., p. 50). Прибавление к бензолу и сероуглероду небольшой доли спирта имеет тот же эффект, что прибавление спирта к лигроину. Пигменты немедленно переходят в раствор, и сразу получается густой раствор хлорофилла.

Что касается сухих листьев, то ни бензол, ни сероуглерод не извлекают из них красящих веществ целиком. В соответствии с этим, порошкообразные вещества адсорбируют хлорофиллины и ксантофиллины из их бензольных и сероуглеродных растворов. Разница с лигроиновыми растворами состоит только в том, что для поглощения определенного количества пигментов в последних требуется меньшее количество адсорбента, чем в первых. Соответственно этому, адсорбент, насыщенный в лигроиновом растворе, отдает часть пигментов бензолу или сероуглероду.

АДСОРБЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРОВ

Не может быть сомнения в том, что так же, как и хлорофилловые пигменты, много других, растворимых в лигроине, бензоле или сероуглероде веществ, окажутся подлежащими адсорбционному поглощению из этих сред. И в этом направлении интересно будет подобрать несколько таких веществ, которые являлись бы химически определенными, доступными для экспериментатора в чистом виде и законы растворимости которых в разных жидкостях были бы известны или легко доступны исследованию.

Располагая серией таких объектов, можно было бы с большей надеждой на успех приступить к исследованию адсорбтивной функции в зависимости ее не только от

свойств адсорбента и растворителя, но и от свойств растворенного вещества.

Весьма пригодным для адсорбционных опытов является, повидимому, *цианин* (хинолеиновая синь) $C_{30}H_{39}N_2J$. Трудно растворимый в эфире и лигроине, цианин легко растворяется в бензоле и адсорбируется из него углекислым кальцием, углекислым натром, окисью свинца, сахарозой и пр. Прибавление к бензолу нескольких капель спирта освобождает пигмент.

Алканин ($C_{15}H_{14}O_4$) в лигроиновом растворе не адсорбируется углекислым кальцием, но удерживается окисью свинца, точь-в-точь как каротин.

Красный пигмент, существующий в продаже под названием *судана* III, относится к адсорбентам, как алканнин.

Испробован был еще мною *лецитин*. Опыт произведен был следующим образом. Желток свежего яйца был взболтан вместе с лигроином, к которому была примешана десятая часть спирта. Получился зернистый осадок и прозрачная желтая жидкость, которая была отлита, выпарена на водяной бане в безвоздушном пространстве, и маслянистый остаток растворен в чистом лигроине.

Несколько кубических сантиметров полученного раствора были пропущены через столб инулина. Жидкость вытекала сначала бесцветной, потом желтой и содержала много жирного вещества. Через столб инулина долго пропускался ток чистого лигроина, пока жидкость не перестала вытекать желтой и давать при испарении капли на шелковой бумаге жирное прозрачное пятно. Тогда через фильтр был пущен ток лигроина с примесью спирта. Из прибора стал вытекать бледножелтый раствор, сухим остатком которого оказалось воскообразное вещество, обладающее двойным преломлением, разбухающее в воде при образовании миелитических форм и разжижающееся в концентрированном водном рас-

творе резорцина, одним словом, представляющее характерный для лецитина комплекс свойств.

Опыт этот показывает, что лецитин адсорбируется из лигроинового раствора и что этим свойством можно воспользоваться для отделения его от обыкновенно сопутствующих ему жировых веществ.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СООБРАЖЕНИЯ

Из описанных в предыдущем серий опытов следует с очевидностью, что адсорбционное поглощение в данных условиях есть процесс физический, в котором химическая природа поглощаемых веществ, т. е. их конституция, прямой роли не играет, так же как и химическая конституция адсорбентов.

Но этим результатом ближайший механизм явлений еще не определяется. Физическую адсорбцию можно себе представлять обусловленной непосредственной конденсацией растворенных молекул на поверхности крупинок адсорбента, в силу гравитационного притяжения.

Адсорбция могла бы объясняться тоже согласно развиваемой Лягергрэном теории[1]. Согласно этому взгляду, слой растворителя, непосредственно граничащий с поверхностью адсорбирующей крупинки, находится вследствие действия молекулярных сил под чрезвычайно высоким давлением; этот слой являлся бы гораздо лучшим растворителем, чем жидкость, находящаяся вне сферы действия твердых частиц, под атмосферным давлением, а потому находящееся в растворе вещество могло бы практически целиком перекочевать в слои растворителя, смачивающие крупинки адсорбента. Несомненно, на основании новейших электрони-

[1] S. Lagergren. Svenska Vet. Akad. Handling. 24 Afd. II, № 4. Реферат в Beiblätter zu den Annalen der Physik, 1899, p. 344.

ческих гипотез[1] касательно природы молекулярных сил, можно было бы тоже выработать схемы физической адсорбции.

Имеющиеся у меня в настоящее время экспериментальные данные касательно количественной стороны адсорбции не обладают достаточной точностью, чтобы на их основании можно было с некоторой пользой дебатировать вопрос о ближайшем механизме явления.

АДСОРБЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

На основании всего предыдушего выясняется возможность выработать новый метод физического отделения различнейших в органических жидкостях веществ. В основе метода лежит свойство растворенных веществ образовывать физические адсорбционные соединения с различнейшими минеральными и органическими твердыми веществами. Количество растворенного вещества, входящее в адсорбционное соединение с определенным количеством адсорбента, зависит от степени раздробленности последнего, от его природы, от природы растворенного вещества и от природы растворителя. Этими разницами можно воспользоваться для отделения вещества путем дробного адсорбционного осаждения их.

В качестве примера может служить применение нового метода к анализу хлорофилла.

В лигроиновый раствор хлорофилла вносится, небольшими порциями, тонкий порошок углекислого кальция, являющегося совершенно индифферентным адсорбентом. Порошок прибавляется до тех пор, пока, после встряхивания и центрифугирования, раствор не принимает чистожелтой окраски, без следов красной флюоресценции, определение

[1] Sutherland, The Electric Origin of Molecular Attraction. Philosoph. Mag., Vol. IV (1902), p. 240.

которой производится в моем флюороскопе (см. loc. cit.). Зеленый углекальциевый осадок взбалтывается с чистым лигроином, пока последний не всплывает совершенно бесцветным, и промывные порции соединяются с первоначальной желтой жидкостью.

Полученная таким образом жидкость вновь подвергается адсорбционному осаждению с избытком углекальциевого порошка. После центрифугирования желтая жидкость отливается. Желтый же осадок промывается чистым лигроином, и промывная жидкость прибавляется к первоначальной. Полученный раствор показывает спектр чистого *каротина*.

I. 475—492 $\mu\mu$.
II. 443—460 „
III. 420—430 „

Желтый осадок встряхивается с лигроином с примесью десятой части абсолютного спирта, в котором он обесцвечивается. Всплывающий желтый раствор дает под спектроскопом:

I. 470—480 $\mu\mu$.
II. 440—452 „

и еще третью, очень слабую полосу, начинающуюся около 425 $\mu\mu$.

Это спектр *ксантофилла* α. При взбалтывании раствора с 80-процентным спиртом, по приему Крауса, лигроиновая фаза становится почти абсолютно бесцветной, между тем как спиртовая представляется желтой и дает только что приведенный спектр.

Что касается зеленого первоначального осадка, то пигменты извлекаются из него спиртовым лигроином и подвергаются дифференциальному растворению по способу Крауса. В лигроиновой фазе остается бóльшая часть хло-

рофиллов α и β, без примеси каротина. В спиртовой фазе остаются следы хлорофиллинов α и β (причем относительно преобладает хлорофиллин β), ксантофилл β и некоторое количество ксантофилла α. Для отделения ксантофилла β можно пользоваться приемом, аналогичным приему Сорби, т. е. взбалтывать повторно спиртовую фазу с новыми порциями лигроина, прибавляя каждый раз немного воды. В спиртовой фазе мало-помалу преобладает ксантофилл β, причем спектр раствора постепенно приближается к положению:

I. 462 — 473 μμ.
II. 435 — 447 „

Бросив общий взгляд на описанный только что анализ хлорофилла, мы видим, что применение к нему адсорбционного метода позволяет: 1) отделить количественно каротин, 2) отделить в чистом виде часть ксантофилла α и таким путем значительно упростить отделение хлорофиллинов. Без сомнения, дальнейшее исследование механизма адсорбции позволит усовершенствовать ее аналитические применения, а эмпирическое определение адсорбционных свойств различных встречающихся в организмах и растворимых в органических жидкостях веществ позволит выработать для разных практических задач определенные адсорбционно-аналитические приемы.



ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ХЛОРОФИЛЛА

АДСОРБЦИИ

(*Поступило 21 июня 1906 г.*[1])



Уже давно известно, что различные, применяемые в качестве растворителей хлорофилла органические жидкости далеко не одинаково полно извлекают зеленый пигмент из листьев растений. В то время как спирт и эфир дают интенсивно окрашенные зеленые вытяжки, другие растворители, вроде алифатических или циклических углеводородов, а также и сероуглерод дают более желтоватые и вообще менее богатые хлорофиллом экстракты, даже тогда, когда вытяжка проводится с высушенным материалом. Наиболее характерно ведут себя в этом отношении петролейный эфир и петролейный бензин, которые из свежих или высушенных при низкой температуре листьев дают более или менее чистожелтые, окрашенные каротином вытяжки; как известно, на этом их свойстве Арно обосновал свой способ получения каротина из листьев.

Но если интегральный хлорофилл вполне растворим в петролейном эфире, как это все считают, то почему-

[1] Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft, 1906, Bd. 24, S. 316—323. [Перевод с немецкого. — Р е д.].

же этот растворитель не воспринимает его из свежих или высушенных листьев? Почему в раствор переходит только один желтый компонент?

Этот вопрос, далеко не безразличный для выяснения физического строения и химического состава хлорофильного аппарата, остается до сих пор неразрешенным. Блестящее развитие химии производных хлорофилла заслонило собой целый ряд значительно более интересных с физиологической точки зрения вопросов. Те немногие исследователи, которые обратили внимание на отмеченные нами явления, предложили различные, взаимно противоречащие объяснения, не обоснованные сколько-нибудь прочно экспериментально.

Первым из них надо отметить *Визнера* (1874), описавшего различие свойств бензола, толуола, скипидара и сероуглерода, как растворителей хлорофилла. Маститый венский физиолог отметил в то же время, что зеленая ткань листа, дающая при непосредственной обработке бензолом лишь желтоватую, слабо флюоресцирующую вытяжку, великолепно извлекается нацело тем же растворителем, если лист предварительно пропитать спиртом.

Визнер объясняет это непроницаемостью для бензола протоплазмы, не допускающей растворитель к хлорофиллу. Спирт же делает протоплазму проницаемой для бензола.

Согласные с этим наблюдения делает позднее *Саксе* (1877). „Так как бензол, сероуглерод и эфирные масла,—говорит он,—нерастворимы или почти нерастворимы в воде, то указанный прием (пропитывание объекта спиртом) имеет своей целью только проложить этим растворителям дорогу к хлорофильным зернам изгнанием из них воды. Из абсолютно сухих растительных частей все эти растворители будут растворять хлорофилл, надо полагать, так же хорошо, как и со спиртом“.

Карл Краус (1875) отмечает также, что бензин извлекает из свежих или высушенных листьев лишь следы хлорофилла, следовательно, неизмененный хлорофилл нерастворим в бензине. Если же извлеченный при помощи спирта хлорофилл оказывается растворимым в бензине, то это указывает на химическое изменение пигмента под воздействием спирта.

Гинье (1885) считает, что хлорофилл заключен в листьях в нерастворимую для петролейного эфира оболочку.

Арно (1885) считает возможным объяснить элективное растворение пигментов листа петролейным эфиром (из высушенного материала) своеобразным анализом, при котором каротин свободно диффундирует, а „зеленые компоненты" задерживаются в листе растворенными в клеточном соке белковыми веществами наподобие процессов в красильном производстве.

Аналогичные краусовским химические представления находим мы в работах *Манча* (1891) и *Монтеверде* (1893). Последний автор приписывает модификационную роль спирту и хочет обосновать свои воззрения на том факте, что зеленые кристаллы Бородина, которые он считает за неизмененный хлорофилл, нерастворимы в петролейном бензине (и петролейном эфире).[1]

Приведенным ограничиваются литературные данные по нашей проблеме.

Переходя к экспериментальной проработке вопроса, я счел необходимым прежде всего ближе изучить воздей-

[1] Я показал (1901), что эти кристаллы не представляют собой неизмененного пигмента, но являются дериватами хлорофиллинов, получаемых под продолжительным воздействием спирта, как это предполагал и сам Бородин (1882). Для этого пигмента я предложил название *детахлорофиллин*. Подчеркну еще раз, что под *хлорофиллом* я разумею всю совокупность зеленых пигментов листа, обозначая зеленые более или менее флуоресцирующие компоненты термином *хлорофиллины*. Необходимо, наконец, притти к точным, научным определениям.

ствие различных индифферентных органических растворителей на пигменты листа in situ.

Из большого числа испробованных объектов особенно удачными оказались листья видов: Plantago и Lamium album. Нежность листьев Lamium и почти полная нейтральность их клеточного сока делают их особенно благодарным опытным объектом (ср. Molisch, 1904).

По отношению к пигментам листа испробованные растворители могут быть разделены на три группы.

1. *Спирты (метиловый, этиловый, амиловый),* ацетон, ацеталдегид, эфир, хлороформ. Все эти растворители при воздействии на свежие или высушенные листья извлекают равномерно и обильно все пигменты.

2. *Петролейный эфир и петролейный бензин.* Свежие тонко растертые с песком или наждаком листья при дальнейшем их растирании с растворителем дают более или менее чисто желтые вытяжки, окрашенные главным образом каротином, но содержащие и следы других пигментов Такой обработкой можно извлечь весь каротин нацело. Высушенные (при низкой температуре) листья также отдают растворителям свой каротин и даже в несколько более чистом виде. Прокипяченные или только нагретые до более высокой температуры ткани дают при растирании с указанными растворителями зеленые вытяжки; объяснение этому мы дадим ниже.

3. *Бензол, ксилол, толуол, сероуглерод.* Все эти растворители в своем воздействии на пигменты листьев занимают промежуточное положение между первыми двумя группами.

Как было сказано выше, петролейный эфир извлекает, помимо каротина, лишь следы других пигментов. Но достаточно прибавить к нему немного абсолютного спирта (10% для свежих и 1% для высушенных листьев), чтобы тотчас же получить густо окрашенные, прекрасные зеленые вытяжки. Также действуют ацетон и эфир.

При помощи спиртсодержащего петролейного эфира можно извлечь из листа нацело весь хлорофилл. На чем же основывается это „растворяющее“ воздействие спирта? Так как одна из составных частей хлорофилла, именно каротин, отлично извлекается чистым петролейным эфиром, то нечего и думать о недоступности для растворителя хлорофилла. Точно так же здесь исключено и химическое воздействие спирта, как видно из следующих опытов. Свежие листья растираются с наждаком, и полученная влага смешивается с 40%-ным спиртом. Если эту смесь тотчас обработать петролейным эфиром, то получается зеленая вытяжка, но если смесь высушить при 45°, то петролейный эфир даст обычную желтую вытяжку каротина. Отсюда очевидно, что спирт действует исключительно своим присутствием, физически, а не химически. И действительно, извлеченные спиртом пигменты, безусловно растворимые в петролейном эфире, становятся в нем снова нерастворимыми.

Первые мои опыты в этом направлении (1901, III) были проведены следующим образом. Петролейно-эфирно-спиртовые вытяжки хлорофилла наливались в колбу, в них бросались полоски фильтровальной бумаги, и растворитель отгонялся in vacuo, причем весь пигмент поглощался бумагой. Сухая зеленая бумага ведет себя по отношению к растворителям совершенно так же, как зеленый лист, и петролейный эфир извлекает из нее один лишь каротин, прибавление же спирта приводит к немедленному обесцвечиванию бумаги.

Отмеченные в начале этой статьи, остававшиеся до сих пор загадочными явления основываются, таким образом, на адсорбции пигментов, на механической, молекулярной связи этих веществ со стромой хлоропластов, которая может быть нарушена спиртом, эфиром и т. п., но не петролейно-эфирными углеводородами. Если же пигменты выходят из предела воздействия молекулярных сил, как, например, при кипячении

или нагревании ткани,—причем, как известно, из хлоропластов выступают небольшие зеленые капельки (ср. Tswett, 1900),— то пигмент легко растворяется в петролейном эфире, и мы получаем интенсивно окрашенные зеленые вытяжки.

Из сказанного следует, что хлорофилл не может представлять микроскопически определенных частиц, включенных в хлоропласты, так как иначе эти частицы должны были бы иметь собственный нерастворимый адсорбирующий субстрат. Впрочем, гранулярная теория и микрографически далеко недостаточно обоснована (ср. Tschirch, 1884 и Tswett, 1896, 1901, III).

Выше было сказано, что внедренные в фильтровальную бумагу хлорофильные пигменты (за исключением каротина) прочно адсорбционно удерживаются субстратом в петролейном эфире. Наоборот, как и следовало ожидать, эти пигменты поглощаются фильтровальной бумагой из их раствора в петролейном эфире. Но не только целлюлоза, а и все нерастворимые в петролейном эфире твердые тела адсорбируют хлорофилл и, примененные в виде тонкого порошка, обесцвечивают его растворы в петролейном эфире частично или нацело (Tswett, 1903). Я обследовал в этом отношении более ста различных химических веществ и всегда с принципиально одинаковым результатом. Приведу здесь краткий перечень испытанных веществ.

Простые тела (S, Si, Zn, Fe, Al, Pb, Sb); окислы (SiO_2 MgO, MnO_2, PbO, Sb_2O_3, Fe_2O_3, Ag_2O, HgO, U_3O_8); гидроокиси ($B(OH)_3$, NaOH, $Ba(OH)_2$, $Al(OH)_3$); неорганические хлориды (Na, K, NH_4, Ca, Mg, Al, Fe, Co, Cu, Hg); хлораты (K, Ba) бромистый калий, иодистый калий; нитраты (K, Ca, Ba, Pb, Ag, Cu, U); фосфаты (K, Na, NH_4 Fe); сульфиды (K, Hg); сульфиты (Na); сульфаты (K, Ca, Mg, Ba, Zn, Fe, Mn, Cu); карбонаты (Na, K, Mg, Fe); силикаты (K), асбест, молибдат аммония, перманганат калия, феррицианкалий и ферроцианкалий, щавелевая кислота, виннокаменная кислота, лимонная

кислота, хинная кислота, дубильная кислота, мочевая кислота, пикриновая кислота, фенолфталеин, оксалаты (NH_4, Mg); ацетаты (Pb, Cu); амиды (мочевина, аспарагин), высшие спирты и углеводы (маннит, дульцит, сахароза, галактоза, инулин, декстрин, крахмал); белковые вещества (яичный белок, пептон, гемоглобин), триоксиметилен, хлоралгидрат, гидрохинон, резорцин, пирогаллол, анилиновые краски (генциана-виолетт, хризоидин и др.) и, наконец, целый ряд химически не определяемых веществ (костный и кровяной уголь, полевая почва, трепел).

Некоторые из перечисленных веществ способны выделять из раствора в петролейном эфире и каротин ($HgCl_2$, $CaCl_2$, PbS и др.); многие вещества разрушают адсорбированные ими пигменты. Одни из них, как, например, MnO_2, $KMnO_4$, U_3O_8, совершенно разрушают хлорофилл, очевидно путем окисления. Другие воздействуют на хлорофиллины, как кислоты; это, естественно, прежде всего большинство перечисленных кислот, кислые соли и многие нейтральные соли, в водных растворах гидролитически дающие кислую реакцию. Здесь не место ближе останавливаться на характере и сущности этих химических воздействий. Остановимся на методике адсорбционных опытов и их применении для аналитических целей.

Для того чтобы получить раствор хлорофилла в петролейном эфире, удобнее всего поступать следующим образом. Свежие листья (лучше всего Lamium) растираются в ступке с тонким наждаком и затем экстрагируются содержащим 10% спирта петролейным эфиром. Зеленый раствор несколько раз промывается двойным объемом воды в разделительной воронке при постоянном взбалтывании.

Так как спирт гораздо легче растворяется в воде, чем в петролейном эфире, таким промыванием его можно практически целиком удалить из раствора хлорофилла. Промытая водой, обычно несколько мутная, вытяжка осветляется цен-

трифугированием или фильтрованием и вполне годна для опытов с адсорбцией.[1]

Как наиболее подходящие адсорбенты можно рекомендовать осажденный углекислый кальций, инулин или сахарозу (сахарная пудра).

При встряхивании петролейно-эфирной вытяжки хлорофилла с адсорбирующим материалом пигменты поглощаются им, и при некотором его избытке в растворе остается один каротин, не подвергающийся адсорбции. Этим путем получается зеленый осадок и чисто желтая, лишенная флуоресценции вытяжка каротина [пробу на флуоресценцию можно производить в моем люминоскопе (1901, II и 1906)]. Этот раствор каротина дает спектр с полосами поглощения 492—475 и 460—445 $\mu\mu$. При взбалтывании этой вытяжки с 80%-ным спиртом нижняя, спирто-водная фаза остается совершенно бесцветной.

Зеленый осадок переносится на фильтр и тщательно промывается петролейным эфиром для удаления последних следов каротина. Отфильтрированную желтую жидкость можно мгновенно регенерировать при помощи костного угля. Осадок затем обрабатывается содержащим спирт петролейным эфиром, причем он вполне обесцвечивается и дает прекрасную зеленую вытяжку, которую можно подвергнуть разделению по Краусу с 80%-ным спиртом. В петролейно-эфирной фазе, синевато-зеленого цвета, содержатся главным образом хлорофиллины, а в нижней, желтой, растворены преимущественно ксантофиллы.

Если к петролейно-эфирному раствору хлорофилла прибавлять адсорбирующее вещество не в избытке, а понемногу,

---

[1] Можно приготовить годную для опытов вытяжку и несколько более простым методом, положив листья на несколько минут в теплую (70—80°) водопроводную воду и затем, после растирания, экстрагировать чистым петролейным эфиром. При этом, однако, в растворе получаются некоторые дериваты хлорофиллинов, на которых мы здесь останавливаться не станем.

до исчезновения флуоресценции, то в растворе остаются вместе с каротином и ксантофиллы. Их можно очистить от каротина, обрабатывая раствор снова адсорбционным веществом и освобождая пигменты из их адсорбционного соединения при помощи спиртсодержащего петролейного эфира.

Полученная таким образом вытяжка смеси ксантофиллов дает полосы поглощения в спектре от 480 до 470 и от 452 до 440 μμ. При взбалтывании с 80% спиртом пигменты переходят почти нацело в спиртовую фазу.

Физическое объяснение описанных адсорбционных явлений будет дано в другом месте. Но уже здесь отметим некоторые ведущие закономерности и вытекающие из них выводы. Насыщенный одним пигментом адсорбент может воспринять и удерживать некоторое количество другого. При этом возможны, однако, и замены. Так, например, ксантофиллы частично вытесняются хлорофиллинами из их адсорбционной связи, но не наоборот. Существует определенный адсорбционный ряд, по которому вещества могут замещать друг друга. Из этой закономерности вытекает следующее важное следствие. Если петролейно-эфирный раствор хлорофилла профильтровывать через столбик адсорбента (я применяю для этого главным образом углекислый кальций, плотно набитый в узкие стеклянные трубки), то пигменты по расположению их в адсорбционном ряду отлагаются отдельными окрашенными зонами по столбику сверху вниз, благодаря тому, что пигменты с более сильно выраженной адсорбцией вытесняют книзу слабее удерживаемые. Это разделение становится практически совершенным, если после пропускания вытяжки пигментов сквозь столбик адсорбента его промывать струей чистого растворителя. Как лучи света в спектре, в столбике углекислого кальция закономерно располагаются различные компоненты смеси пигментов, давая возможность своего качественного и количественного определения. Полу-

чаемый таким образом препарат я называю *хроматограммой*, а предлагаемую методику — *хроматографической*. Дальнейшее развитие ее я дам в одном из следующих сообщений. Быть может, не лишнее отметить и сейчас, что методика эта и по принципу своему, и по необыкновенной применимости и производительности ничего общего не имеет с так называемым капиллярным анализом.

Мы имели в виду до сих пор явления адсорбции хлорофильных пигментов из их раствора в петролейном эфире. Такие же явления можно наблюдать и с растворами пигментов в бензоле, ксилоле, толуоле и сероуглероде. Из бензольного раствора адсорбируются почти только одни хлорофиллины и значительно слабее, чем из петролейно-эфирного раствора. Адсорбция из раствора в сероуглероде выражена весьма резко, и раствор хлорофилла, приготовленный простым растиранием листьев в чистом растворителе, является прекрасным материалом для адсорбционных опытов, в особенности для хроматографического анализа. Различные окрашенные зоны в сероуглероде дают более насыщенную, блестящую окраску, чем в петролейном эфире, и в особенности ксантофиллы резко дифференцируются при этой обработке. Каротин же проходит насквозь в виде окрашенного в розовый цвет раствора.

Само собою разумеется, описанные явления адсорбции присущи не только хлорофильным пигментам; ясно, что самые разнообразные окрашенные или бесцветные химические соединения подлежат тем же закономерностям. До настоящего времени я изучил, со вполне положительным результатом, лецитин, альканнин, продигиозин, судан, цианин, соланорубин и кислотные дериваты хлорофиллинов.

Варшава
Институт физиологии растений университета

ЛИТЕРАТУРА

Arnaud, A. (1885), Comptes rendus, *100*, p. 751.
Borodin, J. (1882). Bot. Ztg., *40*, S. 608.
Guignet, Er. (1885). Compt., rend., *100*, p. 434.
Kraus, K. (1875). Flora, S. 155.
Mann, G. (1891). Transact. of the Bot. Soc. Edinburgh, *18*, p. 414.
Molisch, H. (1904). Bot. Ztg.,' *62*, I Abt., S. 5.
Montewerde, B. (1892). Acta Horti Petropolitani, *13*, S. 124.
Sachsse. R, (1877). Die Chemie und Physiologie der Farbstoffe etc. Leipzig.
Tschirch, A. (1884). Bot. Ztg., *42*, S. 817.
Tswett, M. (1893). Arch. d. Sc. phys. et nat. Genève (IV), *2*, p. 467.
Tswett, M. (1900). Bot. Ztrbl., *81*, S. 81.
Tswett, M. (1901) I. Compt. rend., *132*, p. 149.
Tswett, M. (1901). II. Ztschr. f. phys. Chemie, *36*, S. 450.
Tswett, M. (1901). III. Trav. de la Soc. d. Nat. de Kazan, 35.
Tswett, M. (1903). Trav. de la Soc. d. Nat. de Varsovie, XIV année.
Tswett, M. (1906). Ber. d. deutsch. Bot. Ges., *24*, S. 234.
Wiesner, J. (1874). Sitzungsber. d. Wien. Akad., *69*, I Abt., S. 327.



АДСОРБЦИОННЫЙ АНАЛИЗ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД

ПРИМЕНЕНИЕ К ХИМИИ ХЛОРОФИЛЛА[1]

(Поступило 21 июля 1906 г.)[1]



В предыдущем номере этого журнала я сделал сообщение о замечательных явлениях адсорбции хлорофильных пигментов твердыми телами из петролейно-эфирных или сероуглеродных растворов. Там было показано, как можно получить при помощи фракционированной адсорбции важные разделения, например, количественное отделение каротина. Дальнейшие применения методики будут опубликованы в позднейших работах. Здесь же мы коснемся ближе второй, наиболее важной формы адсорбционного анализа, которую я назвал методом хроматографического анализа. В качестве дополнения я буду говорить и о капиллярном анализе, буду сравнивать его с новой методикой как по существу, так и по применимости в работе.

Обоснования метода. Многие красящие вещества (и, само собой разумеется, также и бесцветные соединения), растворимые в петролейном эфире, бензоле, ксилоле, четырех-

---

[1] Bericthe der deutschen botanischen Gesellschaft, Bd. 24 (1906), S. 384—393. (Перевод с немецкого. — Ред.).

хлористом углероде или сероуглероде, осаждаются из своих растворов физически различными порошкообразными телами путем адсорбции, т. е. конденсации некоторого количества растворенного вещества на поверхности твердых частичек. Распределение вещества между растворителем и адсорбентом не следует закону Генри, как это уже известно для целого ряда явлений адсорбции (ср. например Ван-Беммелена), и коэффициент распределения зависит от концентрации. Для некоторых растворенных веществ и растворителей коэффициент этот бесконечно мал, и растворенное вещество целиком переходит в осадок и не может быть извлечено чистым растворителем. Образуются настоящие недиссоциирующие адсорбционные соединения. Кроме этого прочно удерживаемого количества растворенного вещества, адсорбент способен конденсировать и дальнейшие его количества, причем, быть может, начинает играть роль закон Генри. Избыток адсорбированного вещества может быть удален при помощи чистого растворителя. Из своих адсорбционных соединений вещества освобождаются при помощи спирта, эфира, ацетона, хлороформа или при помощи прибавления этих жидкостей к перечисленным выше растворителям. Адсорбент, насыщенный одним каким-либо веществом, может связать небольшое количество какого-либо другого, причем возможны взаимные замещения. Тело *B* может быть высвобождено из своего насыщенного адсорбционного соединения телом *A*, но не наоборот. Имеется ***адсорбционный ряд***, согласно которому вещества могут заменять друг друга, но он зависит от характера растворителя.

Из сказанного следует: если сложный раствор (например, раствор хлорофилла в сероуглероде) фильтровать сквозь столб адсорбента, то пигменты в процессе адсорбции будут осаждаться, смещая друг друга и располагаясь по адсорбционному ряду вдоль по столбу и по направлению тока. Вещества, не образующие с примененным адсорбентом не-

диссоциирующих адсорбционных соединений, проходят более или менее быстро через весь столб. Последующее фильтрование чистого растворителя приводит, очевидно, к еще более совершенному разделению веществ. Возможна, однако, мысль, что два вещества занимают один и тот же адсорбционный ранг для какого-либо растворителя. Но и в этом случае образование одной общей смешанной зоны было бы предотвращено относительными различиями в концентрации этих веществ. Едва ли также возможна одинаковая адсорбционная потенция двух веществ в различных растворителях. Тем не менее, хотя число адсорбционных зон и отвечает числу разделяемых веществ, может случиться, что какая-нибудь из зон будет абсолютно чиста, как и следует из вышесказанного. В таком случае придется выделить вещество из этой зоны и достичь желаемой степени чистоты новым процессом адсорбции.

Мы видим, таким образом, что законы механического сродства могут быть применены к вполне совершенным физическим разделениям веществ, растворимых в определенных растворителях.

Хроматографические установки. Чтобы в течение нескольких минут получить представление о составе смеси пигментов, удобно воспользоваться изображенной на табл. XVIII, рис. 1 [1], установкой.

Связанная с манометром *M* трехлитровая банка *R* служит резервуаром, в котором при помощи гуттаперчевой груши *P* можно создать через трубку *D* определенное давление воздуха. Груша *P* может быть герметически отчленена от остальных частей аппарата при помощи зажимного крана *Q*. Трубка *D* служит распределителем давления; она снабжена рядом трубчатых придатков, к которым причленяются фильтрационные приспособления. Рис. 2 на таблице

[1] См. рисунки таблицы I в нашем издании (стр. 211) — Ред.

представляет одно из этих приспособлений.[1] Оно состоит из цилиндрического или колбообразного резервуара *z*, заканчивающегося цилиндрической трубкой *f* (30—40 мм длиною, 2—3 мм в диаметре). Трубка эта на своем конце несколько сужена, чтобы создать основу для помещаемого выше адсорбционного материала. Фильтрационная вороночка соединяется с распределителем давления *D* при помощи пробки со стеклянной трубкой и резиновой трубки. Зажимный кран *q* позволяет легко отчленять каждую вороночку от всей установки.

Описанное приспособление весьма удобно для быстрого разделения небольших количеств пигментных растворов. Если же желательно получить большие количества пигментов в виде их адсорбционных соединений, чтобы подвергнуть их дальнейшему изучению, предпочтительно другое приспособление. В этом случае удобнее работать с большего размера адсорбционными воронками (10—20 мм в диаметре), причленяемыми, как видно на рис. 4, к горлышку вытяжной колбы.

Техника. В качестве адсорбционного материала может служить всякое порошкообразное вещество, нерастворимое в данном растворителе. Но так как очень многие вещества оказывают химическое воздействие на адсорбированные тела, то выбор аналитика естественно падает на такие вещества, которые являются химически индифферентными и в то же время могут быть переведены в возможно тонкое порошкообразное состояние. Необходимо также избегать веществ с чересчур сильными адсорбирующими свойствами, так как при работах с ними для достижения дифференцировки потребовалось бы громадное количество пигмента. Тонкость адсорбционного порошка очень важна; при грубозернистом материале получаются размытые хроматограммы,

[1] Для этого удобно пользоваться шлемами от стеклянных приборчиков Фрейденрейха, которые обычно применяются в бактериологии.

так как в нем интерферируют адсорбция и диффузия в чересчур широких капиллярах. Из адсорбентов я пока могу рекомендовать осажденный углекислый кальций, дающий прекрасные хроматограммы. Довольно легко привести в состояние необходимого распыления и сахарозу, представляющую вместе с тем наивысшую гарантию химической пассивности. Для специальных целей пригодны будут, наоборот, химически (гидролитически, восстановительно, окислительно) действующие адсорбционные вещества. Об этом в другом месте.

Для развития полной адсорбционной способности и создания правильной диффузии веществ необходимо следить за возможно более полной *сухостью* адсорбента. Обычно применяемый мною $CaCO_3$ я сушу два часа при 150° и храню в хорошо закупоренных банках. На дне адсорбционной трубки помещается сначала плотная ватная пробка, затем насыпается адсорбционный порошок и тщательно утрамбовывается точно подобранной стеклянной или костяной палочкой. Весьма важно достичь гомогенного уплотнения адсорбирующего столбика, иначе адсорбционные зоны выявляются в виде неправильных образований, крайне затрудняющих механическое их разделение. Когда столбик адсорбента достиг желаемой высоты[1] (я применяю обычно 20—30 мм для маленькой и 40—50 мм для большой фильтрационной воронки), накладывается сверху вторая ватная пробка и наливается немного применяемого растворителя, чтобы пропитать им столбик адсорбента. После этого ватная пробка может быть снята. Если опустить предварительное пропитывание столбика, то часто случается, что при наливании в дальнейшем исследуемой жидкости верхние слои адсорбционного порошка — вероятно под воздействием развивающегося при смачивании

[1] Высокие столбики замедляют фильтрование. Но при слишком небольших высотах столбика может случиться (если пропускается много пигментного раствора), что отдельные окрашенные зоны пройдут насквозь, что впрочем в некоторых случаях бывает желательным.

тепла (Pouillet) — подымаются, переворачиваются под действием образующихся под ними пузырьков воздуха, и остатки их мешают правильному ходу хроматографии.

Фильтрование исследуемой вытяжки я веду под давлением в 250 — 300 мм, а при работе с большими адсорбционными воронками — при полной тяге водяного насоса. Пропустив определенное количество жидкости, переходят к фильтрованию чистого растворителя, причем отдельные адсорбционные зоны несколько расширяются и получают свою окончательную, максимальную дифференцировку. Неадсорбирующиеся вещества вымываются целиком, а вещества, образующие с примененным порошком заметно диссоциирующие адсорбционные соединения, медленно спускаются вниз в виде колец и могут быть уловлены у концевого отверстия трубки, каждое отдельно от других.

Когда хроматограмма (обычно приходится иметь дело с окрашенными веществами) окажется окончательно дифференцированной, препарат освобождается от избытка растворителя положительным или отрицательным давлением так, чтобы он не расплывался, выталкивается из трубки и может быть расчленен ножом на намеченные участки.

Применение к анализу хлорофилла. Зеленый пигмент листьев, хлорофилл, является, как известно, смесью пигментов, сложность которой различными авторами оценивалась весьма различно. Задачей хроматографического анализа является окончательное установление степени этой комплексности. Метод этот по сравнению с другими играет ту же роль, как спектральный анализ при определении окраски по сравнению с анализом при помощи окрашенных стекол. Для получения пригодных вытяжек удобны способы:

1. Экстракция растертого с тончайшим наждачным порошком нейтрализованного небольшим количеством MgO или $CaCO_3$ материала спиртсодержащим петролейным эфиром (1 : 10) и удаление спирта тщательной отмывкой дестиллиро-

ванной водой (ср. Цвет, III). Отмывка эта должна быть произведена особенно тщательно, иначе оставшиеся следы спирта (и воды) образуют особые фазы на поверхности адсорбирующих частиц и хроматограммы получаются неясными.

2. Экстракция растертых, предварительно несколько минут прокипяченных в воде, листьев при помощи чистого петролейного эфира. При этом образуются некоторые продукты распада.

3. Экстракция растертых и нейтрализованных листьев при помощи C_6H_6, Cl_4 или чистого CS_2. Все пигменты переходят в раствор. Особенно можно рекомендовать как растворитель CS_2.

4. Экстракция растертых и нейтрализованных листьев спиртом, ацетоном, эфиром или хлороформом; отгонка растворителя в вакууме и растворение остатка в петролейном эфире или сероуглероде. При этом, однако, трудно избежать химических разложений. Можно также переводить пигменты из спиртового раствора (прибавив воды) непосредственно в петролейный эфир. Необходимо промыть водой.

Само собой разумеется, вся работа с хроматографией должна проводиться при возможном отсутствии света, в особенности при работе с бензольными или сероуглеродными растворами. Получаемая из сероуглеродного раствора хроматограмма имеет следующий вид.

I. *Самая верхняя зона*. Бесцветная. Составляющее эту зону вещество (или смесь веществ) при Краусовском разделении является гипофазным (остается преимущественно в нижней фазе).

II. *Зона, не резко отграниченная от следующей*. Желтая, окрашенная ксантофиллом β.[1] Этот пигмент при Краусовском разделении переходит в нижнюю фазу.

[1] Мой ксантофилл β (вероятно совпадающий с „желтым ксантофиллом“ Сорби) ничего не имеет общего с весьма нецелесообразно названным этим именем Колем (1, 140) пигментом, так как последний вообще не при-

Характерные полосы поглощения спиртового раствора: 474—462 и 445—430 μμ. Спиртовой раствор быстро окрашивается в синий цвет даже от следов соляной кислоты. Этот пигмент можно изолировать, пропуская через хроматограмму, петролейный эфир, содержащий 1% спирта. Все пигменты, кроме ксантофилла β, быстро вымываются; последний же легко освобождается промыванием петролейным эфиром с примесью 10% спирта.

III зона. Темнооливково-зеленая. Хлорофиллин β. При Краусовском разделении переходит в верхнюю зону (эпифазно). Основное поглощение света петролейного раствора 450—465, а в спиртовом растворе 460—475 μμ. Вторая по интенсивности полоса поглощения при 640—650 μμ (в петролейном эфире) и третья при 580—600 μμ.

Хлорофиллин β открыт был еще Сорби (1875), а не Мархлевским и Шунком, как ошибочно утверждается некоторыми новыми авторами (Чапек, Коль I, 139, Страсбургер, 656).[1] Саксе (стр. 332), работавший по способу Крауса, отметил также красную полосу поглощения этого хлорофиллина, но приписал ее ксантофиллу. С своей стороны я проверил в 1901 г. опыты Сорби (Цвет, II). Аргументация Сорби была вполне правильна; Мархлевский и Шунк лишь повторили его опыты, равно как и химические работы Гартлея,

---

надлежит к группе ксантофиллов, а представляет собой растворимый в воде искусственный продукт типа „фикофеина". Частично, видимо, совпадает с моим ксантофиллом β колевский ксантофилл α, характеризующийся полосой поглощения между 455 и 470 μμ.

[1] Данные эти основываются, конечно, на изложении вопроса Мархлевским и Шунком в их немецкой статье (II). Читатель, не знакомый с образцовой работой Сорби (до последнего времени совершенно забытой), легко может составить себе представление, что работа была произведена по методу разделения Сорби. Но сама работа Сорби ни разу даже не процитирована. Ясно, что указанные авторы не могли дать никаких новых доказательств наличия и предсуществования хлорофиллина β. В их английском сообщении (1) вопрос изложен более правильно.

и что касается опытов Сорби, то они повторили их совершенно неудачно, не получив достаточно чистых веществ и не обнаружили фактические адсорбционные соотношения хлорофиллинов α и β в сине-фиолетовой части спектра. Вторая их ошибка, касающаяся хлорофиллина β, это их утверждение, будто этот пигмент находится в листьях в сравнительно незначительных количествах и не играет сколько-нибудь заметной роли в адсорбционном спектре общего хлорофильного раствора (Мархлевский и Шунк, II, 258, Коль I, 139). Один взгляд на мои хроматограммы показывает, что хлорофиллин β сопровождает хлорофиллин α далеко не в малых количествах. С другой стороны, 1 полоса поглощения в сине-фиолетовой части спектра хлорофильной вытяжки принадлежит главным образом хлорофиллину β, как это ясно из щелочной пробы Прейера (стр. 50) и красивых опытов с флуоресценцией Хагенбаха. Если синяя полоса поглощения хлорофиллина β в спиртовом растворе лежит при 460—475 μμ, то в живом листе, нужно думать, она совместится с линией *F*, и именно этому пигменту, а не каротину, нужно приписывать отмеченный Энгельманном, а затем и Колем (III) второй ассимиляционный максимум при *F*

IV З о н а. Темносине-зеленая. Окрашена хлорофиллом α (синим хлорофиллом Сорби). Немного примешанного ксантофилла можно удалить по Краусу. Эпифазна. Не обладает адсорбцией в синей части спектра, но дает полосу поглощения при 440—430 μμ (в петролейном эфире) и вторую в фиолетовой части спектра. Этот пигмент был получен Сорби в 1875 г. в достаточно чистом виде.[1] Мною он был

[1] Когда Коль (I, 156), доверяясь Мархлевскому и Шунку, обозначает их методику получения чистого „хлорофилла" (хлорофиллина α) новой, он впадает в ошибку. Методика эта, с весьма несущественными изменениями, повторяет старую методику Сорби. Во всяком случае Мархлевский и Шунк не имели в руках чистого хлорофиллина α.

Присутствие 1 полосы поглощения позади F говорит, что препарат заключал примесь хлорофиллина β.

получен в кристаллическом виде (1, 1900). Замечание Чапека (стр. 464), что мои кристаллы могут быть филлоцианином, совершенно не обосновано. Как известно, филлоцианин имеет синюю окраску только в растворе с HCl; в спирту, эфире, петролейном эфире он обладает спектром хлорофиллана. Удивительно, как крепко укоренилось предвзятое представление, что в хлорофилле должен присутствовать зеленый пигмент.

V Зона. Желтая (ксантофиллы α' и α'').

VI Зона. Бесцветная.

VII Зона. Оранжево-желтая (ксантофилл α).

Обусловлена ли VI зона наличием какого-либо бесцветного вещества или образуется лишь благодаря перемещению VII зоны (см. выше в обоснованиях метода), я пока не могу сказать. Если пропускать через хроматограмму бензол, то VII зона быстро передвигается вниз и может быть уловлена у отверстия воронки. Зона же V передвигается медленно, распадаясь при этом на двойное кольцо. Следовательно, в ней находятся два вещества. Все эти ксантофиллы я предлагаю обозначать буквою α с показателями. Две первых, хорошо выраженных полосы поглощения ксантофилла α лежат при 485—470 и 455—440 $\mu\mu$ (в алкогольном или петролейно-эфирном растворе). Полосы ксантофилла α' и α'' лишь немного сдвинуты к ультрафиолетовой части спектра.

Ксантофиллы α гипофазны, и их спиртовой раствор под воздействием небольших количеств соляной кислоты не синеет, а обесцвечивается.

Если примененный для хроматографии раствор хлорофилла был в соприкосновении с кислотой, то в хроматограмме появляется еще VIII зона, серого цвета, быстро вымываемая бензолом и образуемая дериватом хлорофиллина (хлорофиллан α). Наконец, в прошедшей насквозь при хроматографии жидкости (в нашем случае с сероуглеродом)

находится каротин, окрашивающий ее в оранжево-красный цвет. Каротин характерно эпифазен. Его спиртовой раствор под воздействием кислоты (соляной), даже крепкой, не окрашивается в синий цвет.[1] Полосы поглощения сероуглеродного раствора: 525—510, 490—472 μμ и очень слабая при 460—455 μμ. В петролейном эфире первые полосы лежат при 492—475 μμ и 460—445 μμ.

Возникает теперь вопрос, не может ли хроматографический метод быть использован, как *хроматометрический.* Весьма подкупала бы возможность выражать количество пигментов просто объемами насыщенного ими адсорбента. Опыты, которые я поставил в этом направлении, не привели, однако, до сих пор к удовлетворительным результатам. Благодаря взаимному воздействию отлагающихся пигментов окрашенные зоны не достигают одинаковой степени насыщения; наиболее выгодно в этом отношении поведение хлорофиллина α.

Ближайшие данные о выделенных мною хлорофильных пигментах и их дериватах я сообщу в течение года в более обширной работе.

Капиллярный анализ. Считаю уместным посвятить здесь несколько слов так называемому, по Гоппелсредеру, капиллярному анализу, тем более, что этот автор в последнее время (II, 239) называет его адсорбционным анализом. Как известно, капиллярный анализ основан на эмпирическом, широко использованном, наблюденном впервые Шенбейном, свойстве компонентов раствора с различной скоростью подыматься по листу фильтровальной бумаги. По утверж-

[1] Противоположные данные Коля (II, 128) основаны на смешении настоящего каротина с ксантофиллами. Раствор каротина в 70% спирта вполне обесцвечивается бензином. То, что здесь Коль считал за каротин, было и могло быть (согласно процессу приготовления) только смесью каротина со всеми ксантофиллами, которые, как мы уже отмечали, являются гипофазными.

дению Оствальда (стр. 1097) в явлении играют роль адсорбционные силы; необходимо, однако, принять в расчет и диффузионные факторы (Фишер и Шмидмер), а также, при капилляризации спиртовых растворов, и ряд других моментов: накопление растворенного вещества вследствие испарения растворителя, осаждение вследствие адсорбции паров воды из воздуха или (при содержащих воду растворах) преобладающего испарения спирта и связанного с ним уменьшения концентрации его. Указанные обстоятельства, наряду с химическими воздействиями (окислениями воздействием кислот), должны быть приняты во внимание при учете наблюдаемых Гоппелсредером пигментных дифференцировок при производимой им капилляризации спиртовых вытяжек из различных растительных органов. Я поставил опыты с капилляризацией спиртовых вытяжек зеленых листьев. Безводные растворы не дают никаких дифференцировок (ср. Мюллера). Содержащие воду вытяжки дали мне следующую картину: сверху бесцветную зону, затем желтый пояс; зеленую зону, желтую (с намеком на зеленую окраску) и затем далее книзу у самого хлорофильного раствора бледнозеленую зону, которую можно получить при вынимании погруженного в раствор куска бумаги. При накладывании бумажной полоски на синюю кобальтовую бумагу верхние зоны, включая и желтый пояс, оказались сильно обводненными. При помещении высушенной бумажной полоски в петролейный эфир выяснилось, что желтый пояс окрашен ксантофиллами, так как он не обесцвечивается (как и зеленая зона); нижняя желтая зона, наоборот, быстро исчезала (каротин). Объяснение указанных капиллярных дифференцировок не представляет затруднений. Вблизи поверхности спиртового раствора хлорофилла идет особенно сильное испарение алкоголя, т. е. прогрессирующее уменьшение концентрации спирта в растворителе, и различные пигменты переходят в осадок по степени их

нерастворимости в слабом спирте; сначала каротин, потом оба хлорофиллина вместе и, наконец, ксантофиллы. Ясно, таким образом, что капиллярный анализ спиртовых растворов не основан на адсорбции и нужно, чтобы не смешивать различные вещи, термин адсорбционный анализ оставить за разработанной мною методикой. Этим, само собою разумеется, не умаляется значение капиллярного анализа, так как хроматографический метод применим только к таким веществам, которые растворимы лишь в определенных жидкостях, вроде петролейного эфира, бензола, сероуглерода, четыреххлористого углерода и т. п.

ЛИТЕРАТУРА

Bemmelen, J. M. van. Ztschr. f. anorg. Chemie, *23* (1900), S. 321.

Czapek, Fr. Biochemie der Pflanzen, *1* (1905).

Fischer, F. und Schmidmer, Ed. Liebig's Ann., *272* (1893), S. 151.

Goppelsroeder, Fr. I. Verhandl. der Naturf. Ges. Basel, *14* (1901). II. Anregung zum Studium der Kapillaranalyse. Basel. 1906.

Hagenbach, Ed. Poggend. Ann., *141* (1870), S. 245.

Hartley, W. N. Journ. of Chem. Soc., *59* (1891), S. 106.

Kohl, F. I. Untersuchungen über das Karotin. Leipzig, 1902. II. Ber. d. deutsch. Bot. Ges., *24*, S. 124. III. Ibid., *24*, S. 222.

Marchlewski, L. und Schunk, C. A. I. Journ. Chem. Soc. *27* (1900), S. 1081. II. Journ. f. prakt. Chemie, *62* (1900), S. 247.

Müller, N. J. C., Pringsh. Jahrb. f. wiss. Botanik, *7* (1869), S. 200.

Ostwald, W., Lehrbuch der. allg. Chemie, *1* (1903).

Preyer, W., Die Blutkristalle, Jena, 1871.

Sachsse, R., Chemie und Physiologie der Farbstoffe, Leipzig. 1877.

Sorby, H., Proc. Roy. Soc., London, *21* (1873), p. 442.

Strasburger, Ed., Das botanische Praktikum, IV Aufl. (1902).

Tswett, M., I. Compt. rend., *131* (1900), p. 842. II, ibid, *132* (1901), p. 149. III. Ber. d. deutsch. bot. Ges., *24* (1906), S. 316.



ХРОМОФИЛЛЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ И ЖИВОТНОМ МИРЕ

Neue Tatsachen sind an sich nur eine geringfügige Bereicherung der Wissenschaft. Ihren Wert erhalten sie erst durch den Zusammenhang, in welchem sie mit bereits bekannten und mit künftig bekannt werdenden stehen.

OSTWALD



ПРЕДИСЛОВИЕ

В предлагаемой монографии сосредоточены и строго координованы с литературными данными результаты многолетних моих исследований над коренным в физиологии вопросом о природе и свойствах фотосинтетических пигментов. Выработанный мною новый аналитический метод, зачаток которого находится в моем русском сочинении от 1901 г., дал возможность более точного расследования упомянутого вопроса, приводящего к коренному изменению наших о нем представлений.

Печатание книги затянулось на целых два года, и появившиеся за это время новые труды по разбираемым вопросам, насколько их не удалось использовать в тексте, упомя-

[1] Новые факты сами по себе лишь незначительно обогащают науку. Свою полную ценность приобретают они лишь в связи с уже известным фондом науки и в подготовке дальнейшего ее продвижения. *ОСТВАЛЬД.*

Ред.

нуты в добавлении. Числа в скобках, помещаемые в тексте за названиями авторов, — сокращенное обозначение времени опубликования (от 1820 г.) приводимых в конце книги трудов.

Средства на отпечатание настоящего труда отпущены Варшавским Университетом и Политехническим Институтом и Варшавским же Обществом естествоиспытателей.

Всем названным учреждениям я считаю приятным долгом выразить свою благодарность.

М. Цвет

Варшава. Февраль, 1910.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 62

ЧАСТЬ ПЕРВАЯ. МЕТОДОЛОГИЯ

Глава I. Методика извлечения пигментов 68
Извлечение спирторастворимых пигментов [69]. Извлечение водорастворимых пигментов [74].

Глава II. О физических методах разделения пигментов 77

Глава III. Адсорбционный анализ. I. Явление адсорбции растворенных веществ 82
Среды адсорбции [83]. Адсорбенты [84]. Адсорбируемые вещества [84]. Законы адсорбции [85]. Быстрота поглощения [86]. Формула равновесия [87]. Зависимость величины адсорбции от природы адсорбента [89]; от природы растворенного вещества [90]; от природы растворителя [91]. Адсорбция из смешанных растворов [91]. Явления адсорбционного замещения [92]. Адсорбция растворителя [92]. Тепловой эффект адсорбции [95]. Теория адсорбции [98].

Глава IV. Адсорбционный анализ. II. Собственные исследования над явлениями адсорбции растворенных веществ 104
Опыты над пигментами хлорофилла [105]. Методика [106]. Наблюдения над адсорбцией из петролейно-эфирного рас-

твора [107]. Сопоставление опытов с различными адсорбентами [110]. Адсорбция водою [115]. Адсорбция из сероуглеродных, бензольных и некоторых других растворов [117]. Явления адсорбционного замещения [118]. Миграция адсорбата в адсорбенте под влиянием тока растворителя [124].

Влияние природы адсорбента на величину адсорбционного поглощения [129]. Влияние на адсорбцию влажности адсорбента [129]. Состояние молекулярной аггрегации адсорбированных пигментов [130]. Химическое воздействие адсорбентов [131]. Опыты над хлорофилланами и различными другими веществами [133]. Теоретические соображения [137].

Глава V. Адсорбционный анализ. III. Дробная адсорбция и хроматографический метод 140
Разъединительная способность адсорбционного анализа [141]. Дробная адсорбция [143]. Хроматографический метод [144]. Хроматографические приборы [144]. Выбор адсорбента [146]. Выбор растворителя [147]. Техника хроматографического анализа [150].

Глава VI. Метод дифференциального растворения 152
Теория [152]. Критика частных методов [155]. Метод Крауса [155]. Метод Стокляса [159]. Метод Стокса и Сорби [161].

Глава VII. Капиллярный анализ. 161
Опыты Шенбейна [161]. Опыты Гоппельсредера [162]. Опыты Мюллера [167]. Опыты Чирха [168], Кона [169].

Глава VIII. Химические методы разделения пигментов 169
Макрохимические методы [169]. Микрохимические методы [171]. Кали-метод [172]. Кислотный метод [174]. Резорциновый метод [176].

Глава IX. Количественный анализ хромофиллов. 178

Глава X. Химическое исследование пигментов 180

Глава XI. Оптическое исследование пигментов 183
Исследование извлеченных из организма пигментов [184]. Качественное спектральное исследование [184]. Количественное спектральное исследование [188]. Исследование флюоресценции [196]. Исследование пигментов в тканях [198].

ЧАСТЬ ВТОРАЯ. ОПИСАТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОЛОГИЯ[1]

Отдел I

Хромофиллы семенных растений и архегониатов.

Глава I. Определения и номенклатура 147
Глава II. Хлорофилл в живых тканях 152
Спектральные свойства [152]. Люминесценция [161].
Глава III. Хлорофилловая вытяжка 162
Физические свойства растворов хлорофилла [163]. Спектральные свойства [163]. Люминесценция [169]. Оптическая деятельность и аномальная дисперсия [170]. Коллоидальный раствор хлорофилла [170]. Химические свойства хлорофилловой вытяжки [173]. Отношение к кислотам [174]. Отношение к щелочам [178[. Отношение к солям [180]. Отношение к окислителям и свету [180]. О причинах оптического изменения хлорофилла при переходе его в раствор [187].
Глава IV. Адсорбционный анализ хлорофилла 190
Глава V. Хлорофиллины 193
Приготовление [193]. Оптические свойства [194]. Спектр хлорофиллина α [195]. Спектр хлорофиллина β [196]. Спектрофотометрия хлорофиллинов [198]. Контрольные опыты к спектроскопии хлорофиллинов [201]. Свойства растворимости хлорофиллинов [206]. Химические свойства хлорофиллинов [208]. Химический состав [208]. Отношение хлорофиллинов к кислотам и щелочам [210]. К истории познания хлорофиллинов [212].
Глава VI. Ксантофиллины 218
Приготовление [218]. Физические свойства [219]. Кристаллизация [219]. Свойства растворимости [220]. Оптические свойства [220]. Химические свойства [221]. Химический состав [221]. Отношение к химическим агентам [223]. К истории познания ксантофиллинов [224].
Глава VII. Дериваты хлорофиллинов 233
Кислотные дериваты [233]. Хлорофилланы [233]. Филлоцианин и филлоксантин [237]. Хлорофиллан, феофи-

[1] Части вторая и третья в настоящем издании не перепечатываются. Оглавление, тем не менее, сохранено, так как дает представление о дальнейшем содержании книги.— Ред.

тин и филлоген [240]. Дальнейшие дериваты хлорофиллинов [241]. Щелочные дериваты [242]. Дериваты группы метахлорофиллинов [243]. Система хлорофиллиновых дериватов [246].

Глава VIII. Количественный состав хлорофилла 264

Глава IX. Естественные модификации хлорофилла 252

Пигменты этиолированных растений [253]. Оптические свойства этиолиновой вытяжки [253]. Компоненты ее [255]. Пигменты осенних листьев [258]. Зимние пигменты листьев хвойных [259]. Пигменты бесхлорофильных сапрофитов [263]. Пигменты панашированных листьев [264].

Глава X. Образование и разрушение хлорофилла 265

Образование хлорофилла [265]. Влияние света [265]. Влияние температуры [269]. Влияние электричества [270]. Химические влияния [270]. Химизм хлорофиллогенеза [271]. — Разрушение хлорофилла [271]. — Концентрация хлорофилла в тканях [273] . . . .

Отдел II

Хромофиллы водорослей и бактерий

Глава I. Общий взгляд 276

Водорастворимые и спирторастворимые компоненты хромофиллов водорослей. Спирторастворимая группа компонентов отнюдь не хлорофилл (за исключением хлорофицей). . . . .

Глава II. Хромофиллы хлорофицей 277

Хромофиллы в растении [278]. Спирторастворимые пигменты (хлорофиллины α и β, каротин, ксантофиллы) [279]. Водорастворимые пигменты (фикоцианин и фикоэритрин) [281].

Глава III. Хромофиллы родофицей 281

Хромофиллы в растении [281]. Водорастворимые пигменты (фикоэритрины и фикоцианины) [284]. Спирторастворимые пигменты (хлорофиллин α, фукоксантин, каротин, ксантофилл) [288], Количественный состав хромофиллов родофицей [291].

Глава IV. Хромофиллы цианофицей 292

Хромофиллы в растении [292]. Водорастворимые пигменты (фикоцианины и фикоэритрины). Спирторастово-

римые пигменты (хлорофиллин α, каротин, фикоксантин) [297]. Количественный состав хромофиллоз цианофицей [299].

Глава V. Хромофилл феофицей 300

Хромофилл в растении [300]. Мнимые водорастворимые пигменты („фикофеин") [302]. Спирторастворимые пигменты (хлорофиллины α и γ, фукоксантин, каротин, фукоксантофилл) [307]. Количественный состав хромофилла и значение фукоксантина в бурой окраске феофицей [314].

Глава VI. Хромофилл диатомей 317

Хромофилл в растении [317]. Пигменты спиртовой вытяжки (хлорофиллины α и λ, фукоксантин, ксантофиллины) [317].

Глава VII. Хромофиллы перидиней 322

Глава VIII. Хромофиллы у бактерий 324

Отдел III

Хромофиллы у флагеллатов и животных

Глава I. Хромофиллы у флагеллатов 328

Глава II. Хромофиллы в животном царстве 332

ЧАСТЬ ТРЕТЬЯ. ЭНЕРГЕТИКА ХРОМОФИЛЛОВ

Глава I. Приход энергии 337

Превращение лучистой энергии в организме [337]. Качество и количество поглощаемой хромофиллами радиации [337]. Актинометрические и фотографические исследования над поглощением лучистой энергии листьями (338). Качественное разнообразие доступной хромофиллоносным организмам энергии [343]. Значение рассеянного света [346].

Глава II. Расход энергии 347

Баланс энергии в натуральных условиях [347]. Количество фотосинтетической работы, производимой в натуральных условиях [349]. Энергетика фотосинтеза в спектре (351). Правдоподобность постулата Л о м м е л я [358]. Активные пигменты хромофиллов [359). Мысли о механизме фотосинтеза (360).

Глава III. К ойкологии хромофиллов 363

Добавления

К вопросу о явлениях адсорбции [367]. К вопросу о спектрах хлорофилла и дериватов хлорофиллинов [367]. К вопросу о спектрах чистых хлорофиллинов [367]. К вопросу о дериватах хлорофиллинов [368]. *(Уже по отпечатании добавления, автор познакомился с новейшей работой Мархлевского (Bioch. Zeitschr. 21, 1909, p. 523), в которой находится запоздалое и не вполне откровенное признание значения трудов автора в деле обновления „химии хлорофилла").* К вопросу о количественном составе хлорофилла [369]. К вопросу о пигментах этиолированных листьев [369]. К вопросу о количественном составе дневного света [369]. К вопросу о количестве фотосинтетической работы в естественных условиях [369].

Указатель пигментов 367
Указатель литературы 201
Объяснение таблиц 211

ВВЕДЕНИЕ

La rigueur ne pourrait pas s'introduire dans les raisonnements si on ne la faisait entrer d'abord dans les définitions.
H. Poincaré[1]

I

Процесс, лежащий в основе существования жизни на нашей планете, — улавливание солнечной лучистой энергии и накопление ее в виде химического потенциала органических веществ происходит, повидимому, повсюду при участии особых светофильтров, *хромофиллов*. Хромофиллы, насколько известно, никогда не являются определенными веществами, химическими индивидами, но состоят из смеси нескольких красящих веществ. Хромофиллы разнятся между собой как по качеству входящих в их состав пигментов, так и по количественному соотношению последних. Из различных комбинаций этих двух факторов — качественного

---

[1] [В рассуждениях не было бы никакой точности, если бы ею не были проникнуты уже наши определения. *А. Пуанкаре.* — Ред.].

и количественного, возникает большое разнообразие в кривых спектрального поглощения хромофиллов, следовательно и в общей результирующей окраске. Окраска хромофиллов не может служить принципом научной классификации их. В лучшем случае она указывает лишь на природу наименее поглощаемых лучей; два хромофилла могут иметь одну и ту же окраску и состоять из совершенно различных пигментов, и наоборот.

Наиболее объективной классификацией хромофиллов явилась бы, очевидно, *химическая*, основанная на качестве и потом на количественном соотношении составных пигментов. Подобная классификация в настоящее время может быть намечена лишь в главных чертах, так как аналитическое расследование хромофиллов находилось до сих пор в младенческом состоянии.

Несмотря на большое разнообразие в окрасках хромофиллов, некоторые из них, по количеству видов организмов, которым они присущи, и по численности представителей этих видов являются доминирующими в природе. Для обозначения соответствующих преобладающих хромофиллов оказались полезными особые термины. *Хлорофилл* — зеленый хлорофилл высших растений, архегониатов и многих водорослей. *Родофилл* — красный хромофилл, встречаемый у большинства багрянок. *Феофилл* — бурый хромофилл многих феофицей и диатомей. *Циачофилл* — зелено-синий хромофилл многих цианофицей.

О необходимости трех последних терминов, особенно последнего из них, можно спорить, так как хромофиллы соответствующих систематических групп водорослей весьма изменчивы в своей окраске и не подлежат консеквентному хроматическому наименованию.

Термин „хлорофилл", введенный в начале прошлого столетия для обозначения целостного зеленого пигмента, извлекаемого из листьев спиртом, стал, к сожалению, в на-

стоящее время двузначущим. Под этим названием понимается и цельный хромофилл зеленых растений (хлорофилловая вытяжка, хлорофильное зерно, хлорофилловая ассимиляция) и мнимое зеленое составное вещество его, существующее только в воображении многих ученых. История возникновения мифа об этом „хлорофилле“ sensu stricto весьма поучительна и будет изложена во второй части настоящего трактата. Отметим пока, что двусмысленность термина *хлорофилл* недопустима в науке. Удерживая за термином его первичное этимологическое значение, мы будем называть хлорофиллинами те составные пигменты, смесь которых соответствует понятию о „хлорофилле“ sensu strictiori большинства авторов.

II

Изучение хромофиллов представляет двоякий интерес. Во-первых, ввиду установленного функционального соотношения фотосинтетической ассимиляции с хромофиллами, обстоятельное расследование последних является, если не a priori необходимым, то все же надежным путем к разъяснению механизма названного процесса. И тут нельзя предсказать, какого рода данные могут явиться более и какие менее важными. Совершенно произвольно было бы утверждать, например, что кардинальным вопросом является химическая природа пресловутого, но не существующего „хлорофилла“ и что попытки, сделанные в этом направлении, отличаются особой важностью.

Кроме вышеуказанного *биохимического* значения, расследование хромофиллов представляет еще значительный *биологический* интерес.

Хромофиллы являются не только целесообразными частями, т. е. органами, фотосинтетической машины, но в них проявляется то свойство, которое Driesch считает характеризующим автономность жизни — *саморегулирование*. Как

показали исследования, произведенные Н. Гайдуковым у Engelmann'a, некоторые водоросли обладают способностью приспособлять свой хромофилл к падающему на них свету, вырабатывая в нем элективное поглощение по отношению к господствующим в данном свете лучам. Едва ли можно сомневаться, что эта „хроматическая приспособляемость" может быть обнаружена и у высших растений; и здесь биологу открывается широкое поле для экспериментального расследования вопроса, столь важного как для теоретической биологии, так и в своем отношении к эволюционным теориям (вариация, наследственность приобретенных эфармонических признаков).

III

Существенным условием всякого плодотворного исследования является обладание пригодной методикой. Tout progrès scientifique est un progrès de mêthode,[1] сказал даже кто-то. К сожалению, методика является нередко самой слабой стороной научных исследований. Каждое поколение в своей главной массе ученически наследует приемы предыдущего и, не подвергая их основательной критике, довольствуясь тем, что они „общеприняты", применяет их для добывания новых результатов, которые получают права гражданства у современников, впоследствии же нередко теряют всякое значение. Как долго количество протеиновых веществ в растительных объектах вычислялось из общего количества содержащегося в них азота? Давно ли и все ли перестали перечислять в „лецитин" весь фосфор „эфирной вытяжки"?

В опросе о хромофиллах XIX столетие завещало нам не органическую рациональную систему приемов, заслуживающую название научной методики, а только несколько отдельных процедур, большей частью случайно выработан-

[1] [Всякий научный прогресс есть прогресс в методе.—Ред.].

ных и слабо или совсем не проверенных в их сущности и работопригодности. В виду этого методология хромофиллов заслуживает самого серьезного внимания, почему ей и посвящена целая *первая часть* настоящего труда.

Вторая часть содержит систематическое описание хромофиллов в разных группах органического мира. В основе этого описания лежат результаты, добытые автором при помощи выработанных им аналитических методов, равно как и критически обработанный существующий в литературе экспериментальный материал.[1] При пользовании последним, руководящим принципом было тщательное выделение действительных фактов от всяких явных или скрытых выводов, при сопоставлении которых получается хаос, могущий привести в ужас даже и специалиста. Факты же, действительные наблюдения, редко противоречат друг другу, ибо если человеку свойственно заблуждаться, то ошибается он преимущественно в суждениях, реже в наблюдениях.

Поэтому мы не можем согласиться с мнением Hansen'a или Etard'a, которые, повидимому, охотно предали бы сожжению всю предшествующую им литературу хлорофилла. Последняя является тягостной только для того, кто поверхностно трактует ее или ошибочные взгляды которого она опровергает, доставляя неблагоприятный контрольный материал. Здесь, как и в других вопросах, не раз выступит для мыслящего естествоиспытателя правдивость образного сравнения Ostwald'a: „При обработке оригинальных трудов по определенному вопросу (причем особенно не следует упускать из виду старейших работ) находишься как бы под деревом, отягченным спелыми плодами: так же, как

[1] Литературе естественных составных пигмента зеленых растений, т. е. хлорофилла, был посвящен в моем труде 1901 года подробный исторический очерк, к которому, не повторяясь, мы и отсылаем читателя.

они, при малейшем движенни спадают к тебе готовые для разработки проблемы“.[1]

Третья, теоретическая часть предлагаемого труда посвящена энергетике хромофиллов. Краеугольный этот вопрос физиологии фотосинтеза органически связан с точным расследованием хромофиллов, благодаря которому только и становится возможным определить участие отдельных *разнородных* составных пигментов в общем световом поглощении. Из экспериментальных же данных о количестве фотосинтетической работы в разных лучах спектра могут быть сделаны выводы относительно участия тех или иных составных пигментов в данной работе; отсюда же, как увидим, возможны теоретические заключения, рабочие гипотезы относительно механизма фотолитического разложения углекислоты.

Критическое сопоставление совокупных наблюдений относительно поглощения и потребления световой энергии в хромофиллоносных тканях, комбинирование их с прежними и новоприобретенными данными о хромофиллах, извлечение из них возможных выводов и попутное опровержение некоторых имеющих курс ошибочных воззрений — такова была наша задача, с выполнением которой устраняется существующий в дидактической и в специальной научной литературе пробел.

[1] Annal. der Naturphilos. *2*, p. 14.

ЧАСТЬ ПЕРВАЯ

МЕТОДОЛОГИЯ

Глава 1

МЕТОДИКА ИЗВЛЕЧЕНИЯ ПИГМЕНТОВ

Все известные до сих пор, причастные к фотосинтезу пигменты разделяются на две группы: одни из них растворимы в спирте и нерастворимы в воде, вторые обладают противоположными свойствами. Вещества первой группы, к которой принадлежат, между прочим, все составные хлорофилла, являются растворимыми также и во многих других органических жидкостях, как-то: в эфире, хлороформе, ацетоне, сероуглероде, бензоле, маслах и пр.; некоторые из них растворяются и в нефтяных углеводородах.

При выработке рациональных методов извлечения фотосинтезных пигментов (употреблявшиеся до сих пор способы носили слишком часто характер случайности) я руководствовался с самого начала моих исследований следующими соображениями.

Лозунгом должно считаться возможное устранение всякого химического воздействия на пигменты, равно при про-

цедурах извлечения, как и в той новой среде, которой является избранный растворитель.

Первым моментом всякого извлечения является разрушение внутриклеточной организации, т. е. тех осмотических преград, благодаря которым разного рода активные вещества могут существовать вместе в протоплазме, не воздействуя друг на друга. Отсюда необходимость сократить по мере возможности продолжительность перехода пигмента из дезорганизованной клетки в растворитель. Последний должен быть вполне нейтральным, индифферентным по отношению к пигментам, должен растворять возможно меньше кислорода, не извлекать из тканей химических деятелей (как, например, кислот) и обладать наименьшей электродиссоциационной силой.

Извлечение спирторастворимых пигментов

Критический обзор приемов, примененных моими предшественниками для извлечения спирторастворимых пигмен-

Растворитель *n*	Растворимость воды в *n*, %	Коэфициенты поглощения кислорода в *n* при 150	Диэлектрическая постоянная ξ	Особые примечания
(Вода)		0.0299	80.10	
Метиловый спирт	∽		33. 4	
Этиловый спирт .	∽	0.2839	25.81	
Ацетон	∽		21.85	
Этиловый эфир .	2.930		4.42	
Хлороформ . . .	0.152		5.05	
Сероуглерод . . .	0.961		2.39	Быстро разлагается на свету
Бензол	0.211		2.26	Активирует кислород
Петролейный эфир	0.335		1.78	

тов, находится в моем сочинении 1901 г.,[1] равно как и изложение тех данных, на которых был основан мною выбор растворителя. Данные эти резюмированы и дополнены в следующей таблице [см. стр. 69. — Ред.]

Числа 3-го столбца представляют средние из определений различных исследователей, сопоставленных Graetz'ом (см. Winkelman 03, S. 135). Согласно развиваемой Nernst'ом теории, они могут служить показателями электродиссоциационной силы соответствующих жидкостей по отношению к растворенным в них электролитам.[2]

Из этой таблицы очевидно несомненное первенство *петролейного эфира,* как наиболее индифферентного растворителя. К сожалению, петролейный эфир извлекает из свежих или сухих листьев, или слоевищ водорослей, почти исключительно одну только составную часть хромофилла, именно каротин. Явление это обусловлено, как я нашел (Цвет 01, Tswett 06), адсорбцией, т. е., так сказать, механическим прилипанием большинства пигментов к остову хроматофоров.

Обильного извлечения всех пигментов посредством петролейного эфира можно достигнуть, подвергнув исследуемую ткань предварительному нагреванию в воде температуры выше 60°C. Опыты с Aesculus, Dactylis glomerata, Elodea, Lamium, Plantago major. Извлечение пигментов тем значительнее, чем выше температура нагревания и чем продолжительнее последнее. Действие предварительного нагревания на растворяемость пигментов в петролейном эфире основывается на том, что при температуре свыше 60° последние, связанные с бесцветным коллоидальным спутником,

[1] Физико-химическое строение хлорофильного зерна. Труды Казанск. Общ. естествоисп., 35.

[2] Для смесей жидкостей применима приблизительно формула пропорциональности $\frac{n E + m E^1}{n + m}$ (Linebarger 96).

выступают из хлоропластов в виде зеленых шариков (хлороглобин) и, удаляясь, таким образом, из сферы действия молекулярных сил остова хлоропласта, могут растворяться в петролейном эфире.

К сожалению, указанный прием непригоден для цели изучения природного пигмента, так как даже при непродолжительном (3 минуты) нагревании в некоторых растениях (может быть, и во многих) возникают особые производные хлорофиллинов, о которых будет речь впоследствии. Кроме того, по легко понятным причинам, появляются всегда, особенно при кипячении, кислотные дериваты хлорофиллинов.

Затруднение, которое встречается вследствие адсорбционных явлений при извлечении тканей петролейным эфиром, возможно устранить, прибавляя к растворителю небольшое количество ($^1/_{20}$ — $^1/_{10}$ часть) метилового или этилового спирта. При извлечении сухой ткани все пигменты переходят тогда непосредственно в растворитель. При экстракции же свежего, водосодержащего материала получается двуфазная система. Растертая ткань образует кашицу, пропитанную водным спиртом; пигменты растворяются в спирте и переходят затем в большем или меньшем количестве в петролейно-эфирную фазу. Некоторые из них более растворимы в нижней фазе (ксантофиллы) и потому являются в ней в большей концентрации, чем в верхней. Но, увеличивая объем последней, заменяя ее свежими порциями петролейного эфира, удается и эти последние пигменты перевести в петролейную фазу. Полученной таким образом петролейно-эфирной жидкости придается большая химическая устойчивость путем удаления из нее спирта; достигается это промыванием жидкости дестиллированной водой.

При соблюдении некоторых предосторожностей (употребление чистых растворителей, устранение света) можно пользоваться для извлечения пигментов *бензолом* и *сероуглеродом*. Обе жидкости извлекают из растираемых в них

свежих (но не сухих) тканей совокупность спирторастворимых пигментов. Получаемые растворы, равно как и петролейно-эфирные (очищенные от спирта), пригодны для отделения составных красящих веществ по моему адсорбционному методу (глава V).

Эфирные экстракты могут играть важную роль в количественном анализе хромофиллов. Посредством этилового эфира всего легче извлечь в кратчайшее время совокупность спирторастворимых красящих веществ при исключении водорастворимых. В отличие от спирта, эфир растворяет очень мало воды, а потому эфирная вытяжка свежей ткани содержит лишь незначительные количества водорастворимых примесей и может быть освобождена от них посредством взбалтывания с дестиллированной водой. Обезвоженная затем посредством встряхивания с безводным Na_2SO_4, она становится химически более устойчивою; растворитель же, благодаря его огромной летучести, легко отогнать в безвоздушном пространстве при слабом нагревании, а пигмент перевести в петролейный эфир, в бензол или сероуглерод.

По моим наблюдениям, эфирные и петролейно-эфирные растворы хлорофилла гораздо более постоянны на свету, чем растворы спиртовые, из чего можно заключить о малой растворимости кислорода в двух первых жидкостях. Тем не менее нужно принять во внимание, что эфир, особенно в присутствии воды, способен под влиянием света соединяться с кислородом, причем образуется перекись водорода и уксусная кислота (Richardson a. Fortey). Отсюда необходимость сохранять запас эфира, как и вообще органических растворителей, в темном помещении.

Спирт, этот классический растворитель, par excellence для хлорофилла, может и впредь — при соблюдении некоторых предосторожностей — играть роль в расследовании хлорофиллов. Не нужно забывать только, что при медлен-

ном настаивании тканей в спирту нередко некоторые составные хлорофилла (хлорофиллины) претерпевают своеобразные изменения (Цвет 00; 01, Tswett 01).

Вообще прием настаивания тканей следует сдать в архив; в оправдание его можно лишь привести ignavam rationem, соображение простоты.

Рационально же приготовленные спиртовые экстракты могут применяться в контрольных целях, например в опытах разделения пигментов в двуфазных системах (отмешивание по Kraus'у).

Что касается *методики экстрагирования*, то избранная мною состоит в следующем. В целях вскрытия всех клеточек исследуемая ткань тщательно растирается в стеклянной ступке вместе с наждаком, к которому, для усреднения тканевых кислот, примешано немного осажденного $CaCO_3$ или MgO. Если ткань очень кислая, то можно прибавить соды.

Сухие, жесткие объекты, как например, листья *Taxus*, очень трудно растираются в сухом наждаке; массу следует увлажнить. Вместо наждака, в качестве размельчающего материала, можно применять стеклянный порошок; так как последний обладает значительной щелочностью (ср. Mylius, Warburg и Ihmori), то при обработке малокислотных объектов, как, например, листья *Lamium* или водяных растений (Tschirch, 84, S. 44), можно обходиться и без особого усреднителя. Употребление стеклянной ступки при работе с наждаком рекомендуется в виду того, что на фарфоре последний оставляет неотмываемые бурые следы.

На тщательно растертую массу наливается растворитель, и растирание продолжается до тех пор, пока густота окраски последнего не перестанет заметно увеличиваться. Раствор сливается, и масса растирается в свежих порциях растворителя, в зависимости от желаемой полноти извлечения.

Наиболее трудно достичь количественного извлечения (из свежих тканей) посредством петролейного эфира с

примесью спирта, в виду образования упомянутой выше двуфазной системы. Поэтому непосредственное извлечение петролейным эфиром непригодно для количественного анализа спирторастворимой группы составных хромофиллов, тем более, что некоторые члены этой группы (например хлорофиллин γ бурых водорослей) вообще не способны растворяться в петролейном эфире, даже при наличности спирта.

В предыдущем была речь об извлечении пигментов из свежих тканей. Предварительное высушивание объектов в большинстве случаев нерационально, так как оно связано почти всегда с дезорганизацией протопластов и с воздействием всевозможных растворимых веществ клетки (между прочим кислых солей или кислоты) на пигмент хроматофоров. Величина этого воздействия — функция температуры и времени. Уменьшить же один из этих двух факторов можно только при условии увеличения другого.

Извлечение водорастворимых пигментов

Извлечение водорастворимых пигментов сопряжено с рядом затруднений, происходящих от того, что вода является единственным физическим растворителем названных веществ. Вода есть среда химических воздействий par excellence. Ее высокая диэлектрическая постоянная — показатель ее способности диссоциировать, следовательно, увеличивать реактивность растворенных в ней электролитов. Кроме того, вода извлекает из клеток, наряду с искомыми пигментами, как раз наиболее способные к реакциям вещества клеточного химизма—органические кислоты или кислые соли, дубильные вещества и пр., равно как и различного рода катализаторы (энзимы).

Отсюда причины изменения извлекаемых пигментов, устранить которые можно лишь путем быстрейшего экстрагирования тонко растертых тканей. Растирание тканей с при-

месью какого-нибудь твердого порошкообразного вещества, имеющее целью вскрытие клеточных оболочек, является в некоторых случаях прямо неизбежным вследствие непроницаемости оболочки для пигментов (ср. Molisch, 06, стр. 806).

При извлечении водой размельченных, со вскрытыми клетками тканей легко может статься (особенно если извлечение происходит путем растирания), что в растворитель переходят в качестве взвешенных частиц микроскопические или ультрамикроскопические частички плазмы или хромопластов. Частички эти, если очень мелки, могут упорно удерживаться в эмульсии, особенно если вода содержит ионы ОН, содействующие эмульгированию (Freundlich u. Losew, 07).

Убедиться в присутствии таких частиц можно посредством моего люминоскопа (Tswett, 1901, II, 1906,1, Цвет, 1901, стр. 58), а устранить — посредством центрифугирования или еще фильтрования через шамберляндовскую свечку (Molisch, 06).

Для извлечения водорастворимых пигментов водорослей пользовались до сих пор различными приемами. Некоторые исследователи просто настаивали слоевища в дестиллированной воде (Nebelung, 78, Schütt, 87), что, при работе с морскими водорослями, довольно быстро ведет к цели, так как, при переносе в данную гипоизотоническую среду, протопласты этих растений быстро погибают и не препятствуют диффузии пигмента.

Для умерщвления протопластов, равно как и для устранения гниения при настаивании, некоторые авторы прибавляли к воде хлороформу (Hegler, Kohl, 03), сероуглероду (Molisch, 94, 95, Hegler) или тимолу (Надсон, 93, Gaidukow, 00, 03, Гайдуков, 99). Однако, согласно новейшему свидетельству Молиша (06), прием этот нерационален, так как названные вещества, в особенности тимол, действуют разрушающе на извлекаемые пигменты. Несколько авторов (Rosanoff, 67, Pringsheim, 75 II, Reinke, 76) прибегали к растиранию водорослей в ступке вместе с дестиллированной водой, причем

растения иногда предварительно высушивались (Nebelung, 78). Molisch рекомендует высушивать водоросли в термостате при 30°, растирать их в тонкий порошок и затем извлекать дестиллированной водой. По моему мнению, высушивание растений, по крайней мере тех, которые при этом погибают, едва ли является рациональным приемом, в виду происходящего при этом увеличения концентрации веществ клеточного сока. Здесь, как и при извлечении спирторастворимых пигментов, тщательное измельчение посредством растирания свежего материала с наждаком или толченым стеклом является a priori наиболее целесообразным.

При водном извлечении растений необходимо считаться с возможностью возникновения при этом красящих веществ, отнюдь не существующих в живом организме и ничего общего с хромофиллами не имеющих. В растительном царстве чрезвычайно распространены принадлежащие к числу так называемых „экстрактивных веществ“ хромогены, которые при выделении их из редуцирующей среды живой протоплазмы, быстро окисляются, принимая желтые, бурые, красные, зеленые, черные окраски. Такого рода вещества находятся в большом количестве у бурых водорослей; из них-то возникает окрашивающий декокты или холодные экстракты из *Феофицей* пресловутый фикофеин, долго считавшийся фотосинтезным пигментом и который, как окончательно выяснили мои исследования, не что иное, как посмертный артефакт, к бурой окраске данных водорослей совсем непричастный.

Несомненно, что рекомендуемое мною для извлечения хромофиллов предварительное тонкое размельчение (растирание) исследуемой ткани создает условия, благоприятные для окисления упомянутых хромогенов, в противоположность приему настаивания материала в дестиллированной (и прокипяченной воде). Таким образом, решение нашей задачи встречается с противоречивыми требованиями.

Справиться с этими затруднениями можно только путем параллельного применения нескольких друг друга контролирующих методов. Имея дело с несколькими неизвестными, мы нуждаемся для их определения в нескольких уравнениях. Не входя в дальнейшее абстрактное обсуждение настоящей проблемы, удовольствуюсь несколькими указаниями, могущими играть эвристическую роль в исследовании фотосинтезных водорастворимых пигментов, или гидрохромов, как их называет Надсон.

В отличие от вышеупомянутых окрашенных экстрактивных веществ, фотосинтезные гидрохромы обладают, насколько известно, без исключения, свойством свертываться при нагревании и способностью флюоресценции.[1] Последняя особенно важна. Благодаря ей возможно определить в смеси красящих веществ—флюоресцирующего и нефлюоресцирующего—полосы поглощения первого. Действительно, отбрасывая в темном помещении солнечный спектр на поверхность флюоресцирующего раствора, жидкость будет светиться как раз в участках, совпадающих с полосами поглощения флюоресцента.

Глава II

О ФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДАХ РАЗДЕЛЕНИЯ ПИГМЕНТОВ

Все известные до сих пор хромофиллы, поскольку они исследованы, являются сложными, и гораздо более, чем это вообще принято думать. Поэтому подготовление отдельных составных пигментов для исследования заключает в себе

---

[1] Случай „фикофеина", как упомянуто, отпадает. Sorby (77) не нашел флюоресценции у одного из различаемых им фикоэритринов красных водорослей (red phycoerythrin). Насколько, однако, этот пигмент представлял собой неизменное, самородное вещество, остается сомнительным (сравни II часть настоящего труда). Некоторые экстрактивные вещества обладают тоже флюоресценцией, но не имеют полос поглощения.

разделение этих пигментов друг от друга и отделение их от всяких посторонних примесей.

Наиболее важна первая часть задачи, в виду того, что центр тяжести исследования данных пигментов лежит для биологии в оптическом познании. Кроме того, хроматология фотосинтезного аппарата, поскольку она является дисциплиной биологической, не может довольствоваться качественным исследованием хромофиллов и должна выработать методы количественного анализа.

Методика анализа хромофиллов находилась до сих пор в зачаточном состоянии и способность ее не много превышала обнаружение самого факта сложности фотосинтезных пигментов. Все же наукой установлена крайняя лабильность большинства названных пигментов и тем самым указаны ею пути, по которым не надо следовать. Аподиктическим значением в анализе хромофиллов могут обладать исключительно методы физические. Химическим же принадлежит иногда и ценная, но все же только вспомогательная роль.

В моем сочинении 1901 г. по поводу хлорофилла приводятся следующие пять физических методов анализа:

1) *Метод дробного растворения.*

2) *Метод дробного осаждения.*

Оба метода основаны на качественных или количественных различиях в растворимости различных веществ в разных средах. Первый из этих методов, известный у французов под названием метода Chevreul'a или „метода последовательных промывок" (lavages successifs) был применен в анализе хлорофилла, без особенного успеха, Frémy, а позднее Etard'ом, который пришел на основании его к ошибочным результатам (о чем будет речь впоследствии).

К методу дробного растворения я причислял дробное извлечение пигментов хлорофилла при последовательной обработке свежих или сухих листьев сперва петролейным эфиром, извлекающим каротин (метод Arnaud), а потом

спиртом. Здесь проявляются, как мы знаем, адсорбционные явления. Последними объясняется и тот факт, что Etard мог извлечь из сухих листьев посредством сероуглерода лишь часть хлорофиллинов; на этом основании французский химик заключил, что извлеченный и не извлеченный сероуглеродом пигменты химически не тождественны. К методу дробного осаждения при участии адсорбционных явлений относится примененное некоторыми исследователями парциальное осаждение спиртового раствора хлорофилла посредством костяного угля, адсорбирующего часть пигментов. Прием этот никоим образом нельзя считать целесообразным.

Уголь изменяет[1] поглощаемые им вещества вообще, а хлорофиллины в частности; с другой стороны остающиеся в растворе вещества отнюдь не защищены от различных факторов изменения, хотя бы вследствие временного соприкосновения с частичками угля.

Под понятие дробного осаждения подходит, наконец, недавно описанный Willstätter'ом (06, II, p. 69) „метод коллоидального раствора", имеющий целью очищение „хлорофилла" от „каротина".

Под названием „хлорофилл" Вилльштеттер разумеет зеленый составной пигмент листовой зелени; под „каротином"—не более реальный единственный желтый пигмент названного хромофилла. Метод „коллоидального раствора" состоит в следующем.

Спиртовая вытяжка хлорофилла, разбавленная не менее, чем тремя объемами воды, не отдает осадка, но превращается в коллоидальный раствор, лишенный красной флюоресценции. Осторожно взболтанный с эфиром, этот коллоидальный раствор не отдает ему ничего или почти ничего, а именно—немного желтого вещества, которое автор называет каротином.

[1] См., например, Freundlich.

Ряд опытов, произведенных мною для проверки показаний Вилльштеттера и описанных во второй части настоящего сочинения, выяснил следующее. При разбавлении спиртовой вытяжки хлорофилла водою, составные пигменты выпадают из раствора в виде мельчайших, ультрамикроскопических частичек, остающихся взвешенными, если жидкость не содержит электролитов. Чем менее растворим в разбавленном спирту какой-нибудь пигмент, тем более он выпадает, тем менее его остается в виде настоящего (не коллоидального) раствора.

Наиболее совершенно, поэтому, должен выпадать каротин, наименее — тот желтый пигмент, который я назвал ксантофиллом β. Поэтому, если осторожно взбалтывать разбавленную водою хлорофильную вытяжку с эфиром, то в последний перейдут лишь находящиеся в настоящем растворе вещества, т. е. преимущественно названный ксантофилл β, но отнюдь не каротин. Мои опыты вполне подтвердили эти предположения. Впрочем, Вилльштеттер в то время, когда производил свои опыты, не умел еще различать каротина от ксантофиллов.

3) *Метод выкристаллизования,*[1] основанный на переходе пигментов из аморфного состояния в кристаллическое, при посредстве растворяющей их слегка среды.

Действительно, вещество в аморфном состоянии может определенного коэффициента растворимости не иметь и, растворяясь в какой-нибудь жидкости, образовать раствор, перенасыщенный относительно того же вещества в кристаллическом виде. Отсюда возможность появления кристалловых зародышей (попытка молекулярно-кинетического объяснения у Coppet), рост последних и постепенный переход всего аморфного вещества в кристаллическое состояние (см. подробности в моем названном труде, стр. 77).Таким

[1] Метод этот был мною назван менее благозвучно, если не менее удачно, методом мокрой возгонки.

процессом я объяснил возникновение различных желтых кристаллов в микрохимических опытах Бородина (Borodine, 83).

Во всяком случае, настоящий метод — микрохимический или, точнее, микрофизический и может разделять пигменты лишь в поле зрения микроскопа.

4) *Метод дифференциального растворения,* основанный на неравномерном распределении пигментов между обоими слоями двуфазных систем, как, например: спирт + бензин (метод Kraus'a и Milliardet) или спирт + сероуглерод (метод Stokes,a и Sorby).

5) *Диффузионный метод*, основанный на различиях в скорости диффузии отдельных составных сложного пигмента. К явлениям диффузии я сводил красочные дифференциации, наблюденные Müller'ом (69) и Goppelsroeder'ом (89); первым при испарении спиртовой (воду содержащей) хлорофилловой вытяжки в фарфоровой чаше; вторым при капиллярном восхождении таковой же вытяжки в фильтровальной бумаге.

Дальнейшие изложенные ниже (глава VII) исследования показали мне, однако, что главную роль в данных парциальных разделениях пигментов играет дробное осаждение веществ.

В упомянутом труде (стр. 86 и сл.) находился в зачатке разработанный с 1903 г. (Цвет, 03, Tswett, 06 III, IV) и подробно изложенный в следующих главах *адсорбционный анализ.*

Новое аналитическое орудие упраздняет, как менее совершенные, все вышеприведенные методы, за исключением метода дифференциального растворения, могущего играть вспомогательную и проверочную роль. Работоспособности его, определенной помощью адсорбционного анализа, а также усовершенствованиям его посвящена глава VI.

Наконец, адсорбционный метод позволяет выяснить сущность и практическое значение так называемого *капиллярного анализа,* о чем трактует глава VII.

Глава III

АДСОРБЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

I. Явление адсорбции растворенных веществ

По мнению Sachsse (88), уже Аристотелю были известны поглотительные свойства почвы по отношению к солям, так как он указывает на превращение морской воды в питьевую при прохождении ее через слой земли. Мнение это, не подкрепленное цитатою, представляется мне, однако, основанным на неправильном толковании Стагирита.[1]

Протагонистом в вопросе об адсорбции следует считать Lowitz'а, открывшего в 1790 г. обесцвечивающее действие древесного угля на растворы (ср. Graham). Figuier (1810) открыл затем, что такими же свойствами, но в большем размере, обладает животный уголь. Поглотительные свойства

---

[1] Так например, мы находим в книге „*Problemata inedita*" (Sectio II) следующие слова: Quamobrem in littore fodientes dulcem reperimus aquam? Quia crassa est aqua marina, quippe e multis constans. Itaque subtiles ejus partes per tellurem subeunt; dulce autem est tenue, quemadmodum crassum salsum. В том же смысле *Problemata* (Sec. XXIII): Aquae per terram profluentes percolantur; dum autem percolantur quantum crassissimum et gravissimum est, id semper magis magisque subsidit; quantum vero leve atque purum secernitur: salsum enim grave, dulce vero leve est; hinc dulces defluae sunt. (*Aristotelis opera omnia;* Parisiis, Firmin Didot, 1862 IV).

[«Каким образом можем мы получить на морском берегу пресную воду? Ведь морская вода богата солями, многими насыщена. Но наиболее тонкие ее части проходят сквозь толщу почвы, давая пресную воду, между тем как соль остается в почве». В том же смысле: «Вода, проходящая сквозь слой почвы, очищается; во время этого очищения все более тяжелые загрязнения оседают в почве все сильнее и сильнее, все же более легкие и чистые составные части высвобождаются: солевые части оказываются более тяжелыми, а пресная вода — более легкой. Благодаря тому проходит насквозь одна пресная вода.» — Ред.]

угля, распространяющиеся и на многие бесцветные и минеральные вещества, были в истекшем столетии предметом многочисленных исследований (см. Mussprat, Ostwald, 06).

Выяснилось, что обесцвечивающими свойствами обладают и многие другие пористые или тонко измельченные вещества (фосфорнокислая известь, сернистый свинец, гидрат окиси алюминия и пр.). Так как во многих случаях химическое соединение поглотителя и поглощенного вещества являлось весьма невероятным, то начал устанавливаться взгляд, по которому данные поглощения обусловлены физическим притяжением между твердыми телами и растворенными веществами (также и газами), результатом чего является конденсация последних на поверхности первых. Frankenheim (35) предложил меткое название адсорбции для такого рода поверхностного поглощения (ср. Du Bois-Reymond, p. 38).

Явлениям адсорбции растворенных веществ и проявляющимся в них закономерностям было посвящено, особенно в последнее время, много исследований, результаты которых (за исключением уже опубликованных моих) излагаются в последующих параграфах.

Моим собственным исследованиям посвящена следующая глава.

Среды адсорбции (растворители)

Большинство адсорбционных исследований производились над веществами, растворенными в воде. Лишь в последнее время стали изучать органические растворители: спирт (Kroecker, 92, Schmidt, 94, Lachaud, 96, Walker a. Appleyard, 96, Freundlich, 06), *эфир* (Freundlich), *бензол* (Walker a. Appleyard, Freundlich, Davis 07), *толуол, хлороформ* (Davis), *анизол, ацетон* (Freundlich), *уксусная кислота* (Kroecker, Walker a. Appleyard).

Адсорбенты (поглотители)

Наиболее часто расследован был в качестве адсорбента уголь, в различных его видах животного и растительного происхождения, в зернистом или в порошкообразном состоянии.

В числе минеральных адсорбентов изучались: песок, пуццоляна, толченый кирпич (Chevreul, 53), гидраты железа, глинозема; окиси цинка, железа, свинца; двуокиси меди, марганца; сернистый мышьяк, хромат свинца, фосфат кальция, иодистый свинец, сурьмяная кислота, однохлористая ртуть, сера (Filhol, 52); растительная почва (Van Bemmelen, 75, 88); гидрогель кремнезема; гидрозоли окисей железа, алюминия, кремния и др. (Van Bemmelen, 00); каолин (Lagergren, 98, Freundlich), толченое стекло (Lagergren), толченая глина и цементы (Rohland, 07), кварц (Nasse, Freundlich), аморфный (осажденный) кремнезем (Thomson, Gore, 94, Schmidt, 94, Mojoin et Pelet, 08).

Адсорбционные свойства были констатированы и более или менее исследованы: для бумаги (Chevreul, 53, Bayley, Lloyd, Schmidt, Freundlich u. Losew), для шелка (Chevreul, Schmidt, Walker'a. Appleyard), шерсти (Chevreul, Freundlich u. Losew, Mojoin et Pelet), желатины (Bayliss), индиго (Filhol, 52).

Сюда же должны относиться, по крайней мере отчасти, многочисленные технические окраски прядильных волокон, а также гистологические окраски.

Адсорбируемые вещества

Адсорбция минеральных солей и кислот была уже предметом исследований Graham'a (для животного угля) и Chevreul'a, который нашел, что бумага, шерсть или шелк, погруженные в водные растворы веществ ($NaCl$, $HgCl_2$, $Ba(NO_3)^2$, $Pb(NO_3)^2$, H_2SO_4, HCl и пр.), часто изменяют в том или другом направлении концентрацию последних, впитывая в се-

бя в неодинаковой пропорции растворитель и растворенное.

Более точные и обширные исследования над адсорбцией минеральных веществ (кислот, щелочей, солей Br, J, Cl) произведены в последние десятилетия Krecker'ом, Lagergren'ом, Ostwald'ом и Freundlich'ом. Все четверо пользовались в качестве адсорбента углем, Lagergren, кроме того, применял каолин. Давно известное свойство угля поглощать не только краски, но и другие органические вещества, подробно исследовано Freundlich'ом (ароматические и алифатические кислоты и соли, сахар и пр.).

Lachaud исследовал поглощение углем хинина, салициловой кислоты, декстрина, таннина и желатина (в теплом водном растворе). Здесь мы уже имеем дело с коллоидально растворенными веществами (таннин, желатин), равно как и в большинстве опытов поглощения анилиновых красок (Schmidt, Nasse, Freundlich u. Losew, Pelet et Grand). О поглощении коллоидально растворенных веществ писали Van Bemmelen (00) и Biltz (04), исследовавший поглощение различных гидрозолей (Se, Te, Au, VaO_5, SbS и др.) шерстью, бумагой и шелком.

Законы адсорбции

При разборе качественного и количественного экспериментального материала по явлениям поглощения углем или же какими-либо иными веществами, с целью установить законы адсорбции, нужно принимать во внимание, что последняя нередко сопровождается и усложняется явлениями другого, главным образом химического, порядка. Животный и растительный уголь, поглотительные свойства которого до сих пор преимущественно исследовались, едва ли может считаться способным входить в реакцию с большинством веществ, предлагаемых ему для адсорбции, но зато он обладает каталитическими свойствами, на целый ряд которых

указывают, например, Cazeneuve (90), Freundlich (стр. 11): окисление муравьиной, лимонной и миндальной кислот, а также глицерина, гидролиз Cl и Br (образование HCl и HBr), этерификация кислот в спиртовом растворе.

Выяснить законы адсорбции можно, следовательно, только при работе с неподдающимися подобным изменениям веществами или при возможном ограничении продолжительности отдельных опытов.

Такие условия наиболее осуществлены в исследованиях Ostwald'a, Lachaud'a, Lagergren'a, Van Bemmelen'a (07), Freundlich'a и Losew'a (06—07). Названными трудами несомненно устанавливается, что адсорбционное поглощение — явление определенного равновесия, легко устанавливающегося с одной, как и с другой стороны, причем адсорбируемое вещество распределяется в известной пропорции между растворителем и адсорбентом. Опыты производились обыкновенно следующим образом: в определенный объем раствора известной концентрации вводится определенное количество порошкообразного, очищенного посредством соляной кислоты и высушенного угля (костяного, кровяного, древесного, сахарного и пр.). Смесь подвергается повторному встряхиванию, и через некоторое время после того, как адсорбент отстоялся, жидкость декантируется и в ней определяется, химическим или спектроколориметрическим путем, концентрация растворенного вещества.

Б ы с т р о т а п о г л о щ е н и я. Адсорбционное равновесие достигается быстро. По Lagergren'y (стр. 9) оно устанавливается в течение 9 часов; такую же цифру дает Van Bemmelen (стр. 345); Lachaud получает равновесие в течение 30 — 40 минут; Freundlich встряхивает смесь несколько раз в руке и ставит затем в термостат для отстаивания. Данные Kroecker'a, по которым адсорбция брома углем длится 22 дня, Lagergren справедливо объясняет вмешательством побочных процессов (образование HBr).

Davis, исследовавший в прошлом году адсорбцию иода растительным углем, нашел, что течение ее распадается на два фазиса. В первом она идет очень быстро, но затем продолжается медленно в течение недель и месяцев. Это последнее поглощение автор старается объяснить, допуская диффузию иода в само вещество углевых крупинок. Подобное допущение делает Travers (06) для адсорбции газов; едва ли, однако, в опытах Davis'а не играют роли побочные химические процессы.

Ход адсорбционного поглощения (углем) был исследован Lagergren'ом для щавелевой и янтарной кислот. Он выражается удовлетворительно формулой

$$x = X(1 - e^{-kt}),$$

где X — количество вещества, поглощенного по достижении равновесия, x—количество вещества, поглощенного во время t от начала опыта, а k постоянная.

Следовательно, поглощение, сначала быстрое, асимптотически замедляется, приближаясь к пределу.

Lagergren (стр. 34) отмечает, что, согласно теории, поглощение должно было бы происходить моментально, ввиду незначительности тех молекулярных расстояний, на которых происходит конденсация вещества. Наблюдаемую же на деле длительность процесса он объясняет пористостью углевых частичек, которая не допускает моментального смачивания раствором всей внутренней поверхности частичек.

Ф о р м у л а р а в н о в е с и я. Выше названные исследования новейшего времени доказали, что в адсорбционных равновесиях, устанавливающихся между определенным адсорбентом и определенным веществом, растворенным в определенной жидкости, количество поглощенного вещества при данной массе адсорбента и данной температуре зависит исключительно от концентрации остающегося в растворе вещества. Если назвать условно концентрацией поглощенного вещества (c')

весовое соотношение его к адсорбенту, то соотношение c' к концентрации c остающегося в растворе вещества не есть постоянная, что соответствовало бы закону Henry, но выражается формулой

$$\frac{c'}{c} = k = f(c),$$

где k — непостоянная, зависящая от c и величина которой уменьшается, когда c возрастает.[1] Соотношение $\frac{c'}{c}$ соответствует *адсорбционному коэффициенту* Ostwald'а (Band II, 252).

Следовательно, адсорбционные коэффициенты наиболее значительны при слабых концентрациях, и количество поглощенного вещества возрастает с концентрацией последнего в растворе, но менее быстро, постепенно приближаясь к пределу, определяемому коэффициентом растворимости. Что касается определения функциональной зависимости k от c, то было предложено несколько формул, наиболее удачной из которых является, повидимому, показательная функция Freundlich'а

$$\frac{x}{m} = \beta c^{\frac{1}{P}} = \beta \left(\frac{a-x}{v}\right)^{\frac{1}{P}},$$

где v — объем жидкости, a — количество растворенного вещества (в начале опыта), x — количество поглощенного вещества, m — количество адсорбента, β и p — постоянные, зависящие от природы растворенного вещества и адсорбента, а также от температуры.[2]

---

[1] Утверждение Schmidt'а, что при адсорбции KCl посредством аморфной кремнекислоты k есть постоянная, неосновательно. Приведенные им числовые данные, несомненно, показывают, что k, хотя и в незначительной степени, постоянно уменьшается при возрастающей концентрации солевого раствора.

[2] Freundlich предложил еще иную формулировку (λ — функция), на несовершенство которой указывает McBain.

С настоящей формулой хорошо согласуются экспериментальные данные, полученные Pelet et Grand (07) и Mojoin et Pelet (08).

При возрастающей температуре коэффициенты адсорбции падают; влияние это, впрочем, незначительно (Lagergren, Freundlich). Подобное же влияние температуры наблюдается и для адсорбции газов (Dewar, 04).

Вышеприведенная формула непригодна для водных растворов сильно диссоциированных веществ (Freundlich), а также для коллоидальных растворов, как показывают опыты Van Bemmelen'a (00) над поглощением гидрозоля As_2S_3 углем и наблюдения Lachaud над поглощением таннина и декстрина из водных растворов. Ниже известной концентрации поглощение является полным, без распределения между адсорбентом и средой.

При поглощении некоторых базических красок углем и прядильными волокнами наблюдается разложение краски, причем пигментное основание поглощается, а кислота остается количественно в растворе. Здесь нет надобности принимать химического взаимодействия между адсорбентом и пигментом или гидролитического расщепления последнего в растворе (Freundlich u. Losew).

Наблюденное Kroecker'ом наступление щелочной реакции в растворах нейтральных солей при адсорбции углем Lagergren объясняет освобождением из угля следов щелочей, удерживаемых в нем примешанной кремнекислотой.

Зависимость величины адсорбции от природы адсорбента. Величина адсорбции (β в предыдущей формуле) для каждого отдельного поглощаемого вещества зависит от природы употребляемого адсорбента; под словом же природа здесь понимается сложный комплекс физико-химических свойств адсорбирующих зернышек, их химическое строение, вес, величина, поверхность.

Расчленить этот комплекс, выяснить функциональное соотношение между его составными факторами и величинами адсорбции до сих пор не удалось, и к решению этой задачи серьезно даже еще не приступали. Можно лишь отметить

факт, что вещества, которые, подобно углю или гидрогелям, благодаря своему состоянию крайней раздробленности представляют наибольшую „внутреннюю“ поверхность, обладают наибольшей поглотительной способностью.

Другой вопрос, относящийся сюда, — следующего рода. Если мы для какого-нибудь адсорбента определим величины адсорбции для ряда растворенных веществ и соединим полученные числа в кривую, то будет ли последняя параллельна такого же рода кривым, установленным для иных адсорбентов, являясь характерной для данной серии растворенных веществ, независимо от природы адсорбента? На этот вопрос имеются противоречивые ответы.

Lachaud нашел для нескольких сортов угля, что упомянутые кривые не только не параллельны, но даже могут пересекаться. С другой стороны, Freundlich и Losew, работая с углем и прядильными волокнами, установили для нескольких анилиновых красок полный параллелизм кривых. Очевидно, вопрос требует дальнейшей разработки.

Зависимость величины адсорбции от природы растворенного вещества. Из довольно многочисленных числовых определений новейших авторов по величинам адсорбции различных растворенных веществ не удалось вывести общих законов зависимости этих величин от природы поглощаемых веществ. В числе частичных подмеченных закономерностей можно указать на наблюдения Lachaud над поглощением углем солей салициловой кислоты; величина адсорбции (не перечисленная, впрочем, на эквиваленты) возрастала с молекулярным весом. Очень сильную адсорбцию нашел Freundlich для ароматических кислот и для галоидов, очень слабую для минеральных солей. Показатель $\frac{1}{p}$ в приведенной на стр. 88 формуле колеблется по Фрейндлиху между величинами 0.2 и 0.5, независимо от природы растворителя, растворенного и адсорбента. Для исследован-

ных ими анилиновых красок Freundlich и Losew нашли еще меньшие адсорбционные показатели, причем для Kristallviolet $\frac{1}{p}$ оказался даже величиной отрицательной.

В опытах Lagergren'a обнаружилась для некоторых солей ($NaCl$, KCl, NH_4Cl, NH_4Br, $MgCl_2$) *отрицательная* адсорбция, т. е., вместо конденсации, разрежение растворенного вещества на поверхности адсорбента (уголь и каолин). Но Freundlich не мог подтвердить существование этого явления.

Зависимость величины адсорбции от природы растворителя. По наблюдениям Freundlich'a, произведенным, впрочем, лишь над немногими веществами, адсорбция в органических растворителях менее значительна, чем в воде. По теоретическим соображениям можно предполагать, что величина адсорбции одного и того же вещества в разных растворителях будет тем значительнее, чем худшим растворителем является жидкость для данного вещества.

Подобное предположение оправдывается для поглощения иода углем из воды и из спирта (Kroecker). Тем не менее, по наблюдениям Walker'a и Appleyard'a, шелк поглощает пикриновую кислоту из спиртового раствора, но не принимает ее из бензола или четыреххлористого углерода, хотя бензол является худшим растворителем данной кислоты. Замечательно и то, что предварительно окрашенный пикриновою кислотою шелк не обесцвечивается бензолом или четыреххлористым углеродом.

Адсорбция из смешанных растворов. Вопрос об адсорбции из смешанных растворов почти еще не исследован. Из сопоставления данных старой литературы, сделанного Van Bemmelen'ом, видно, что из разбавленных растворов отдельные составные поглощаются независимо, пропорционально их частным коэффициентам. В концентрированных же растворах наступают физические и химические взаимодействия, систематически еще не изученные, причем наблю-

даются явления замещения. Lachaud нашел, что прибавление небольшого количества салициловой кислоты к раствору декстрина вполне устраняет поглощение последнего углем.

Явления адсорбционного замещения. Явления замещения поглощенных из раствора веществ были неоднократно наблюдаемы: так, Van Bemmelen (80) нашел, что $AlCl_3$, поглощенный гидрогелем кремнистого ангидрида, H_2SO_4, удерживаемая красным гидрогелем окиси марганца, и $CaCl_2$, адсорбированный гидрогелем окиси хрома, могут быть удалены растворами KCl или K_2SO_4.

Quincke (02) видел, что растворенный K_2CO_3 вытесняется $CaCl_2$ с поверхности стекла. Подробное исследование этого темного еще вопроса можно найти у Van Bemmelen'a (00). Ему же посвящена диссертация Imass'a (99).

Адсорбция растворителя. Явлению конденсации на поверхности твердых тел подлежат не только растворенные вещества, но и растворитель. Доказательства существования адсорбции растворителя следующие.

Твердые тела в очень измельченном виде поглощают пары растворителей (как и вообще газы). Точно исследовано поглощение водяных паров стеклом (Bunsen, 85), глиной, окисями железа и кобальта, древесным углем (Müller-Erzbach, 86); поглощение паров бензола и сероуглерода — глиной и окисью железа (Müller-Erzbach, 89.)

Поглощение паров связано, разумеется, с понижением их напряжения в паросодержащей среде, и понижение это тем более значительно, чем меньше насыщен поглотитель (Bunsen, 85, Müller-Erzbach, 85). К тому же результату пришел Van Bemmelen (93, 97), исследуя испарение воды из разных гидрогелей при определенных напряжениях паров в окружающей атмосфере.

При смачивании нерастворимых порошкообразных веществ наблюдается выделение теплоты. Это явление („effet Pouillet"), открытое сначала при смачивании водою, имеет место при

других жидкостях: спирте, сероуглероде, эфире, бензоле, керосине, глицерине, маслах (Pouillet, Maschke, Meissner, Marini, 98).

Вышеприведенные факты указывают на то, что слои жидкости, прилегающие к поверхности смачиваемого ею твердого тела, находятся под давлением, результирующим от сил притяжения между твердым телом и жидкостью.

Принимая в расчет радиус сферы действия молекулярных сил (50 $\mu\mu$ по Quincke), площадь поверхности поглощающего тела и наблюденные Bunsen'ом (83) и Chappuis (81) величины поглощения газов стеклом и углем, можно попытаться вычислить плотность адсорбированных газов и соответственные давления. Подобные расчеты, сделанные Bunsen'ом для CO_2 поглощаемой стеклом, произвел Lagergren (99, II) для давления, существующего в слоях жидкости, смачивающей уголь, и определил его в несколько тысяч атмосфер. Возражение Ostwald'a (00), что при увеличенном давлении на жидкость напряжение ее паров возрастает, между тем как адсорбированная вода обладает уменьшенным против нормального давлением паров, представляется мне несостоятельным как основанное на следующем недоразумении.

То, что называется напряжением паров какой-нибудь жидкости, есть, строго говоря, давление насыщенных паров ее в тонком, непосредственно к поверхности жидкости прилегающем слое безвоздушного пространства.

Величина этого напряжения зависит, между прочим, от высоты столба паров, давящих на жидкость, т. е. зависит вообще от давления, испытываемого жидкостью. Таким образом, напряжение паров всего значительнее в непосредственном соседстве с жидкостью и уменьшается постепенно в вышележащих слоях. С этой неоднородностью столба паров над жидкостью можно в обыкновенных условиях не считаться, так как могущие происходить отсюда погрешности бесконечно малы. Так, например, можно считать, что при введени

какой-нибудь жидкости в торричелиеву пустоту, истинное напряжение ее паров определяется степенью падения уровня ртути.

Совсем иначе при определении напряжения паров жидкости адсорбированной. Здесь, хотя и на незначительном протяжении, жидкость и ее пары находятся под влиянием молекулярного притяжения адсорбента, величина которого обратно пропорциональна 4-й степени расстояния (Sutherland), а потому является громадной. Поэтому в столбе паров, лежащем на слое адсорбированной жидкости, поскольку этот столб еще находится в сфере действия молекулярного притяжения адсорбента, давление будет чрезвычайно быстро изменяться, уменьшаясь по мере удаления от поверхности адсорбирующего тела и становясь, наконец, равным тому давлению, которое господствует в окружающей среде и которое мы измеряем, ошибочно думая, что оно представляет давление паров адсорбированной жидкости. Последнее гораздо значительнее.

Такие же ошибочные результаты мы получили бы, если, желая определить напряжение паров воды, поместили бы последнюю на дне вертикальной, длиною в несколько километров трубки, а давление паров, по установлении равновесия, измеряли бы на верхнем конце.

Таким образом исчезает кажущееся противоречие между теорией конденсации жидкостей на поверхности смачиваемых ими тел и термодинамически доказанным законом, по которому давление увеличивает напряжения паров жидкостей.

Несколькими авторами были сделаны попытки определить толщину капиллярного слоя воды, адсорбированной из влажного воздуха на поверхности стеклянной ваты или осажденного кремнезема. Parks (03) помещал в камеру, насыщенную водяными парами, определенное количество стеклянной ваты, площадь поверхности которой была вычислена и, посредством взвешивания ваты, наблюдал прирост

количества адсорбированной воды. Вычисление дало максимальную величину в 134 $\mu\mu$ при 12—15°С.

В адсорбции воды стеклом замешаны и химические явления: а именно — растворимость стекла в этой жидкости (ср. Warburg u. Ihmori, 86). Интересны поэтому вычисления, которые сделал Parks относительно толщины капиллярного слоя воды, удерживаемого кремнеземом, основываясь на числовых данных Martini (00) и Bellati и Finazzi (02) о выделении теплоты при смачивании кремнезема водою. Вычисления эти приводят к величинам того же порядка, что и специально для занимающей нас цели поставленные опыты Parks'a. Результаты этого автора совпадают тоже в достаточной степени с определениями Barus'a (02) относительно размеров водяного слоя, сгущающегося на пыльных ядрах.

При адсорбции жидкостей на поверхности твердых тел наблюдаются явления замещения. Уже Chevreul (66) заметил, что масло (прованское) вытесняет воду, пропитывающую свинцовые белила, и, наоборот, вытесняется водою из глины каолина.

Quincke (77) определил для стекла следующий ряд замещения: сероуглерод, керосин, прованское масло, спирт, скипидар, вода, ртуть. Каждый из членов этого ряда вытесняет последующие и вытесняется предыдущими.

Порядок замещения зависит, впрочем, от твердого тела: вода вытесняет спирт с поверхности животного пузыря, но вытесняется им с поверхности каучука. Müller-Erzbach (02) установил, что водяные пары вытесняют адсорбированные глиной пары сероуглерода.

Тепловой эффект адсорбции

Выделение теплоты при смачивании жидкостями нерастворимых в них твердых тел было открыто Pouillet в 1892 г. Явление это, получившее название „effet Pouillet“, было пред-

метом многочисленных исследований, обзор которых можно найти у Parks'а (02) и у Schwalbe (05). Невозможность рассматривать его, как следствие химического соединения между твердым телом и жидкостью, указывает на то, что при смачивании происходит конденсация, сжимание жидкости на поверхности твердого тела. Заметим, что пропитывание порошкообразного вещества жидкостью имело бы само по себе обратный тепловой эффект — поглощение теплоты, так как при этом происходит громадное увеличение поверхности жидкости, следовательно, увеличение потенциальной энергии системы.[1]

Parks (02) нашел для площади поверхности исследованных им веществ следующие величины:

	Диам. частич.	Площадь поверхн. одного грам.
Кремнезем	0.00025 с	10900 с²
(осажденный)	0.00040 „	6820 „
Песок	0.010 „	231 „
Стеклянная вата	0.00175 „	847 „
(цилиндр. нити)		

Для всех этих веществ, при смачивании их водою, получалось одинаковое выделение теплоты, а именно в среднем 0.00105 мал. калорий для одного квадратного сантиметра поверхности (при температуре 7° С). Несогласные результаты получал Linebarger (01), наблюдавший, что тепловой эффект (pro c^2) возрастает с уменьшением диаметра частичек.

[1] Соответственно этому постулату при погружении стеклянной ваты в ртуть, которою она *не смачивается*, наблюдается *понижение* температуры и обратно—*повышение* ее при извлечении ваты из жидкости (Parks, 02, стр. 253).

Martini (00), а также Bellati и Finazzi (02) не производили расчетов для поверхности порошкообразного кремнезема, исследованного ими с точки зрения эффекта Pouillet; они определили количество теплоты, выделяемой одним граммом порошка, первый — в 19 кал., а последние — в 26 кал. В более ранней работе Martini (98) нашел для теплоты смачивания кремнезема 13.73 кал, а для животного угля 14.45 кал.

Определения теплоты смачивания органическими жидкостями сделал Meissner.

Вопрос о тепловом эффекте адсорбции растворенных веществ совсем еще не разработан. Gore (94) производил термометрические наблюдения над выделением теплоты при смачивании осажденного кремнезема и глинозема водой и водяными растворами разнообразных веществ. Обнаружилось, что некоторые растворы дают меньшее, другие же большее повышение температуры, чем чистая вода. Последняя давала при смачивании кремнезема повышение в 0.30° C, между тем как 10-процентные растворы $Na_2\ CO_3$ и KCN дали повышения: первый — в 0.004, второй — в 0.82. При смачивании же глинозема раствор KCN производит меньшее нагревание, чем вода. Для объяснения факта, что некоторые растворы менее теплородны, чем вода, Gore (94 C) останавливается на предположении, что выделение теплоты в данных случаях отчасти покрывается поглощением теплоты, связанным с освобождением адсорбированного воздуха. Очевидно, толкование это несостоятельно, так как вытеснение воздуха происходит и при смачивании чистой водой.

О выделении теплоты при адсорбции свидетельствуют косвенным образом новейшие опыты Lewis'а (p. 520).

Теория адсорбции

Существующие теории адсорбции, в частности адсорбции растворенных веществ, можно сгруппировать в три категории: химические, физические и термодинамические, между которыми, впрочем, нельзя провести резких границ.

Согласно *химическим теориям* (Müller-Erzbach, 02), едва ли имеющим еще много защитников, в адсорбции действуют те же силы, которые управляют обыкновенными химическими явлениями, и адсорбционное поглощение основано либо на образовании определенного, но легко диссоциирующего соединения между поглощаемым веществом и адсорбентом, на поверхности последнего, либо на двойном разложении. Несомненно, процессы такого рода имеют место во многих случаях поглощения растворенных веществ пористыми или порошкообразными телами; но подобные случаи следует исключить из категории настоящих адсорбционных явлений, с которыми они иногда комбинируются, как, например, в процессах поглощения почвой (Van Bemmelen, 00, Freundlich).

Обобщение же непозволительно не только потому, что допущение химического сродства между адсорбентом и адсорбатом во многих вышеупомянутых случаях совершенно произвольно, но и потому, что существование адсорбции физической вообще a priori лежит вне всякого сомнения (см. дальше).

К химическим теориям адсорбции примыкает гипотеза (впрочем мало обоснованная) Vaubell'a, по которой при поглощении газов углем образуются молекулярные соединения обоих веществ, причем здесь действует особое сродство (Gravitoaffinität), зависящее от молекулярного веса частиц адсорбента и газа.

В числе *физических теорий* наиболее давней является учение Graham'a (30), согласно которому связь между адсорбентом и поглощаемым им из раствора веществом — такого

же механического рода, как связь последнего с растворителем, с той разницей, что адсорбируемое вещество проникает внутрь адсорбента. Нечто родственное этому взгляду мы встречаем в теории, рассматривающей явления адсорбционного поглощения как следствие неравномерного распределения вещества между двумя растворителями, причем поглощенное вещество образует с адсорбентом твердый раствор.

Защитник последнего взгляда, применительно к „субстантивным" окраскам прядильных волокон, Witt, основывается на том, что поглощенные пигменты обладают теми оптическими свойствами, которые присущи им в растворе а не в твердом состоянии. Однако названные свойства зависят от степени аггрегации молекул, а последняя может оставаться такой же в адсорбированном веществе, как и в растворенном. С другой стороны, Schmidt, исследовавший распределение пигмента между растворителем и волокном, отнюдь не нашел его согласным с законом Хенри, как того требовала бы теория Witt'a.

Lagergren, принимая, что слой жидкости, непосредственно прилегающий к смачиваемому ею твердому телу, находится под чрезвычайно сильным молекулярным давлением (см. выше), а также, что коэффициент растворимости веществ зависит от давления, испытываемого растворителем, уподобляет адсорбционное равновесие распределению вещества между двумя неодинаково растворяющими его жидкостями. Поэтому те вещества, которых растворимость увеличивается под давлением, должны испытывать *положительную адсорбцию*, т. е. сгущаться на поверхности твердых тел; вещества же, на растворимость которых давление оказывает противоположное действие, будут подлежать *отрицательной адсорбции.*

Против теории Lagergren'a были сделаны Ostwald'ом (00) возражения, одно из которых (касательно сдавливания, сма-

чивающего слои жидкости) мы уже разобрали и устранили. Второе состоит в том, что коэффициент растворимости определяет равновесие между твердой фазой и насыщенным раствором, между тем как в явлениях адсорбции нет ни того ни другого. Как известно, коэффициент распределения растворимого вещества между двумя несмешивающимися жидкостями *А* и *В* не равняется отношению его коэффициентов растворимости в *А* и *В* (Berthelot, 72). Но все же в данном распределении концентрация растворенного вещества значительнее в той жидкости, относительно которой его коэффициент растворимости наибольший. Указанное возражение, следовательно, не имеет решающего значения.

Freundlich, разбирая теорию Lagergren'a, отмечает, что ее можно принять, изменив в том смысле, что те вещества стремятся проникнуть в место большого давления, которые увеличивают сжимаемость раствора и уменьшают его объем. Однако и при таком видоизменении между теорией и наблюдениями Lagergren'a существуют противоречия. Так, например, в его опытах адсорбция $CaCl_2$ из воды (углем или каолином) является отрицательной, хотя давление увеличивает растворимость этой соли (Stackelberg).

Теория Lagergren'a основывается собственно на допущении существования на границе раствора и смачиваемого им твердого тела адсорбированного слоя растворителя, находящегося под высоким давлением. Взаимодействие между адсорбентом и растворенным веществом не признается. Адсорбцию же растворителя Lagergren объясняет молекулярными силами притяжения.

Закон молекулярного тяготения при адсорбции воды, бензола или сероуглерода пытался найти Müller-Erzbach (86, 89). Он определял окольным путем сравнительное напряжение паров (*p*, *p'*, *p''*) свободной жидкости и жидкости, адсорбированной на глиноземе, угле и пр., при определенном содержании ее в адсорбенте. Из весового отношения

жидкости к адсорбенту вычислялась относительная мощность удерживаемого слоя. Для определения энергии притяжения в разных расстояниях от поверхности адсорбента автор вычислял количество калорий, которое необходимо было бы отнять от жидкости, чтобы уменьшить напряжение ее паров до соответствующей величины p, p', p''. Из сопоставления расстояний слоев от поверхности твердого тела и соответствующих величин энергии притяжения автор выводит заключение, что притяжение изменяется обратно пропорционально квадрату расстояния, как в законе Ньютона.

На самом деле, в формуле Müller-Erzbach'a

$$\frac{F}{F'} = \frac{r'^x}{r^x},$$

где F, F'—силы притяжения в различных уровнях, отстоящие от поверхности на величины r, r', x колеблется между 1,7 и 3,3. Кроме того, способ вычисления автора вызывает, между прочим, и следующее возражение: почему векторы r, r' . . . отсчитываются от поверхности смачиваемых частиц? Очевидно, что место приложения равнодействующей молекулярного притяжения находится на некоторой глубине в адсорбенте на расстоянии $m = 1/2\ \rho$, где ρ есть радиус сферы действия молекулярных сил, т. е. приблизительно, по допущению автора, для данного случая 150 μ.

Следовательно, при определении закона притяжения по вышеприведенной формуле должно было бы писать

$$\frac{F}{F'} = \frac{(m + r')^x}{(m + r)^x}$$

и для величины x получились бы иные, более высокие значения.

Молекулярное притяжение, зависящее, может быть, не от молекулярных масс в обычном смысле слова, а от масс, связанных с молекулами электронов (Sutherland), управляется

законом обратной пропорциональности 4-й степени расстояния.

Между тем как вышеупомянутые физические теории пытаются дать нам аналитически каузальное, хотя бы только качественное, объяснение явлений адсорбции, теории *термодинамические* стремятся только установить неизбежную логическую связь между данными явлениями и обоими началами термодинамики. Они дают не causam efficientem, а только causam formalem. В высшей степени пригодные для количественной обработки вопроса, под условием наличности вспомогательных эмпирических законов, они не дают полного удовлетворения уму, тем более, что из лежащих в их основании принципов термодинамики лишь первый обладает свойством аксиомы, универсального постулата; второй же сам нуждается в объяснении.

Quincke (77) исходит из соображений о смачиваемости в зависимости от поверхностных натяжений на границе между твердым телом и жидкостью. Обозначим через α_{12} и α_{13} поверхностные натяжения на границе между твердым телом *(1)* и жидкостями *(2)* или *(3)*. При условии, что (*2*) и (*3*) смешиваются во всех пропорциях, т. е, что $\alpha_{23}=0$ (Quincke, 70), жидкость *(3)* способна вытеснить *(2)* с поверхности *(1)*, если $\alpha_{13} < \alpha_{12}$. Так как ненасыщенный раствор какого-нибудь вещества можно рассматривать как смесь насыщенного раствора *(2)* с водою *(3)*, то при смачивании ими твердого тела *(1)* будет происходить неравномерное распределение растворенного вещества. Если $\alpha_{12} < \alpha_{13}$, то произойдет положительная адсорбция растворенного вещества; если $\alpha_{12} > \alpha_{13}$ — отрицательная. Отношение $\frac{\alpha_{12}}{\alpha_{13}}$ нельзя вычислить из поверхностных напряжений α_2 и α_3 жидкостей на границе воздуха или в пустом пространстве; α_{12} и α_{13} должны быть определены специальными опытами и зависят от природы тела *(1)*. Кри-

тические замечания по поводу теории Quincke, к которой примыкает и Thomson (89), сделаны Freundlich'ом. Некоторые несогласные с теорией Quincke наблюдения произведены его же учеником в его лаборатории (Imass, 99, стр. 23).

Прочнее поставлена теория, аналитическая формулировка которой находится у Gibbs'a (стр. 271, 353) и к которой примыкают Ostwald (00) и Freundlich.

На поверхности тела *(s)*, смачиваемого какой-нибудь жидкостью *(f)*, господствует поверхностная энергия *sf*. Так как эта энергия потенциальная, то она стремится к минимуму; поэтому, если какое-нибудь вещество, растворяясь в *f*, уменьшает *sf*, то оно будет накопляться на границе твердого тела, и наоборот. Так как эмпирически установлено, что поверхностное натяжение жидкостей изменяется относительно значительнее всего небольшими количествами растворяемых в них веществ, т. е. что понижение поверхностного натяжения раствора возрастает менее быстро, чем концентрация, то становится понятным, почему в адсорбционном поглощении коэффициенты адсорбции значительнее при слабых концентрациях.

Аналогическое термодинамическое рассуждение произведено Milner'ом для адсорбции растворенных в воде веществ на границе газа, т. е. на свободной поверхности раствора. Он показал, что здесь должен образоваться положительный или отрицательный „поверхностный излишек“ *(surface excess)*, смотря по тому, понижает или увеличивает растворенное вещество поверхностное натяжение воды. Большинство солей принадлежит к последней категории. Некоторые органические вещества имеют обратное действие.

Экспериментальную проверку теории Гиббса предпринял в новейшее время Lewis (08), который исследовал адсорбцию гликохолевого натрия, а также конго и метилоранжа из водных растворов на поверхности жидких адсорбентов не определяемых ближе углеводородов („hydrocarbon oils“

A as *B*). Автор определял непосредственно, по капельному методу, величину поверхностного натяжения на границе между жидким углеводородом и различной концентрации водными растворами вышеупомянутых веществ. Это натяжение уменьшается по мере возрастания концентрации, сначала быстро падая, затем приближаясь уже медленно к известному пределу.

Количество действительно адсорбированного вещества оказалось, по неразъясненным причинам, в 20 — 80 раз больше вычисленного по формуле Гиббса:

$$\Gamma = -\frac{c}{RT}\frac{d\sigma}{dc}$$

где Γ — масса вещества, адсорбированного на единице площади поверхности, c — концентрация, σ — соответствующее поверхностное натяжение на единице поверхности.

В качестве примера приведу, что при концентрации гликохолята натрия в воде в 0,25% равновесная концентрация вещества в поверхностном слое (принимая толщину последнего равной 134 $\mu\mu$) является, по вычислению автора, в 160 раз больше.

Глава IV

АДСОРБЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

II. Собственные исследования над явлениями адсорбции растворенных веществ

Исходной точкой настоящих исследований были мои давнишние опыты над причинами той элективной „растворяемости“, которую представляют пигменты хлорофилла при попытке извлечь их из листьев посредством петролейного эфира (см. выше стр. 70).

Пропитывая хлорофиллом фильтровальную бумагу, мне удалось создать искусственный лист, который, подобно настоящему, отдает бензину или петролейному эфиру только каротин. Впоследствии оказалось, что бумага не только не отдает петролейному эфиру отложенных на ее поверхности красящих веществ, но что она извлекает последние из раствора. Бумага, положенная в петролейно-эфирный раствор хлорофилла, окрашивается в зеленый цвет, между тем как раствор, при условии достаточного количества бумаги, принимает желтый цвет.

Но не только бумага, а и *всякое пористое или порошкообразное вещество,* т. е. всякое вещество, обладающее большой поверхностью, способно извлекать из названного раствора часть пигментов.

Ввиду разнообразия примененных в качестве поглотителей веществ и химической индифферентности хлорофилловых пигментов мы имеем, очевидно, дело с явлениями не химического, а физического порядка, обусловленными поверхностной энергией тел и изучение которых может составить новую интересную главу учения об адсорбции.

Опыты над пигментами хлорофилла

Хлорофилл, как будет доказано во второй части настоящего труда, представляет смесь многочисленных пигментов, которые можно разбить на две группы: хлорофиллины и ксантофиллины.

Хлорофиллины суть вещества, растворы которых (эфирные, петролейно-эфирные и спиртовые) обладают синей (хлорофиллин α) или зеленой (хлорофиллин β) окраской и красной флюоресценцией. В спектре поглощения этих веществ наблюдаются полосы как в правой, так и в левой половине спектра. В двуфазной системе, образуемой из 80-процентного спирта и бензина или петролейного эфира,

хлорофиллины растворяются преимущественно в верхнем петролейно-эфирном слое, они *эпифазны*.

Ксантофиллины обладают в вышеназванных растворителях желтой окраской, не имеют ни флюоресценции, ни полос поглощения в левой красной части видимого спектра. В группе ксантофиллинов следует различать: каротин (или каротины) и ксантофиллы (α, α', β).

Помимо различий в спектре поглощения, между каротином и ксантофиллами зеленого листа существует еще та диагностическая разница, что первый в высшей степени *эпифазен* в системе спирт — петролейный эфир, между тем как ксантофиллы *гипофазны*.

Методика. Опыты адсорбции производились трояким образом:

1) Адсорбент, превращенный в тонкий порошок путем тщательного растирания в совершенно сухой ступке, всыпался в узкогорлую воронку (формы, описанной в следующей главе), кончик которой, для задержания порошка, затыкался ватной пробкой или снабжался привязанным колпачком из фильтровальной бумаги. Порошок равномерно уплотнялся с помощью стеклянной палочки, и затем в воронку или прямо наливался раствор хлорофилла, или же через порошок предварительно пропускался, для вытеснения воздуха, чистый растворитель. Фильтрация производилась под отрицательным или положительным давлением. Соответствующие приборы описаны в следующей главе.

2) Раствор хлорофилла наливался в пробирку, и затем туда же всыпался адсорбент. После энергичного встряхивания содержимое пробирки подвергалось центробежной силе, причем адсорбент скоплялся на дне, увлекая с собой поглощенные им пигменты. Или же наоборот: в пробирку сперва всыпался адсорбент, встряхивался предварительно с большим количеством чистого растворителя, и затем уже добавлялся раствор хлорофилла.

3) При опытах с очень гигроскопическими, быстро расплывающимися на воздухе веществами, как, например нитраты меди и кальция, хлористая медь и др., раствор хлорофилла вливался в ступку, сюда же прямо из банки всыпался адсорбент и растирался тут уже под раствором пигмента.

Наблюдения над адсорбцией из петролейно-эфирного раствора. В качестве адсорбентов было испытано более ста различных веществ, принадлежащих к разнообразным группам химической системы. Во всех без исключения случаях было обнаружено явление адсорбционного поглощения пигментов, нередко усложняемое химическим изменением некоторых пигментов вследствие воздействия адсорбента на сгущенные на его поверхности вещества. Во всех случаях адсорбция для большинства пигментов обнаружила то замечательное свойство, что она являлась в известных пределах полною, т. е. без уловимого нашими средствами распределения вещества между растворителем и адсорбентом. При наличности достаточного количества адсорбента пигменты (за исключением обыкновенно каротина) целиком выпадали из растворителя в виде адсорбционных соединений с адсорбентом и растворителем совсем не отмывались.

Во избежание лишних повторений, неминуемых при протоколярном изложении нескольких сот опытов, ограничимся здесь описанием результатов опытов с инулином и углекислым кальцием, являющимися вполне нейтральными адсорбентами. Сопоставление всех результатов опытов, полученных с иными адсорбентами, будет дано ниже, равно как и описание побочных химических изменений, претерпеваемых иногда адсорбированными пигментами.

При встряхивании петролейно-эфирного раствора хлорофилла с инулином (препарат Kahlbaum'a) или с углекислым кальцием (calcium carbonicum praecipitatum) часть пигментов

немедленно поглощается, и оседающий на дне пробирки порошок является зеленым, между тем как просветляющаяся жидкость принимает тем более чистый желтый цвет, чем более было взято адсорбента. При достаточном количестве адсорбента хлорофиллины вполне выпадают из раствора, о чем свидетельствует не только спектроскопическое наблюдение, но даже чрезвычайно чувствительная проба на красную флюоресценцию, произведенная посредством моего люминоскопа [1] (Т. 01, II; 06, I; Ц. 01, стр. 58).

Желтый, окрашенный смесью ксантофиллинов раствор, при встряхивании с новой порцией адсорбента, отдает ему еще часть пигментов, а именно ксантофиллы, между тем как каротин, даже при любом избытке адсорбента, в растворе остается.

Каротин, следовательно, из петролейно-эфирного раствора инулином или углекислым кальцием не удерживается. Отсюда еще не следует, что каротин не адсорбируется в широком смысле слова, что он не сгущается на границе растворителя и адсорбента; но адсорбция эта неполная, как для других хлорофилловых пигментов, и устанавливающаяся при равновесии разница концентрации каротина внутри растворителя и на поверхности его настолько незначительна, что пигмент легко вымывается чистым растворителем. Тут неуместно говорить об адсорбционном соединении.

Вернемся теперь к зеленому осадку, полученному при встряхивании хлорофиллового раствора с избытком адсор-

[1] Люминоскоп (или флюороскоп), описанный мною в 1901 г. и послуживший, кажется, исходной точкой для изобретения ультрамикроскопа Siedentopf'a и Szigmondy (1902), усовершенствован недавно Ley и Gorke, приспособившими его, между прочим, к одновременному сравнительному наблюдению двух жидкостей. Новый прибор уступает, однако, моему в смысле простоты конструкции и манипуляций (вместо пробирок употребляются прямоугольно-параллелепипедные кюветки), чувствительность же его, как говорят авторы, такая же, как моего аппарата.

бента. Встряхивая его повторно с чистым петролейным эфиром, мы удаляем последние оставшиеся в нем по капиллярности следы каротина, и жидкость, наконец, всплывает совершенно бесцветной. Удерживаемые в зеленом порошке пигменты можно моментально освободить, встряхивая последний в спирту, ацетоне, эфире, хлороформе, петролейном эфире с примесью спирта. Бензол и сероуглерод извлекают лишь часть пигментов. Для извлечения пигментов из адсорбционного их соединения наиболее удобно и рационально пользоваться петролейным эфиром с примесью $^1/_{10}$ спирта. Спектроскопическое исследование полученного зеленого раствора свидетельствует о том, что пигменты не изменились. При взбалтывании раствора с 80%-ным спиртом наблюдается нормальная „краусовская реакция". Спиртовая фаза, в которой преобладают ксантофиллы, является яркожелтой, а петролейно-эфирная, содержащая главным образом оба хлорофиллина, имеет сине-зеленый цвет. Пигменты можно вновь перевести в чистый петролейно-эфирный раствор, откуда они вновь поглощаются инулином, углекислым кальцием и другими порошкообразными телами.

Особенно поучительно наблюдение адсорбционных явлений при фильтрации через порошок. Из нижнего конца воронки вытекает сперва жидкость бесцветная, потом желтая. Последняя окрашена каротином, как показывают спектроскопическое исследование и эпифазность пигмента в системе 80%-ный спирт + петролейный эфир. Поглощаемые же пигменты отлагаются в верхних слоях адсорбента, причем масса адсорбента не является окрашенной однообразно, а расслаивается на несколько различно окрашенных зон, соответствующих различным составным пигментам и следующих одна за другой в определенном порядке. Это замечательное явление, имеющее, кроме теоретического интереса, большое практическое значение, будет подробно расследовано ниже.

Сопоставление результатов опытов с различными адсорбентами. В следующей таблице сопоставлены в систематическом порядке все испробованные мною в качестве адсорбентов нерастворимые в петролейном эфире вещества, с указанием их поглотительных свойств относительно главных групп составных пигментов хлорофилла. Знак + обозначает наличность *полной* адсорбции, знак — отсутствие адсорбции. Знак △ указывает на то, что данный адсорбент изменяет поглощаемые им пигменты, ? показывает, что пигмент разрушается как таковой, превращаясь в один или несколько бесцветных продуктов. Отсутствие последних двух знаков должно пониматься так, что в условиях опытов (в большинстве случаев непродолжительных) изменения адсорбированных пигментов не наблюдалось. Большая часть примененных препаратов были немецких фирм Кальбаума, Мерка, Шеринга и Грюблера.

Наименование адсорбента	Хлорофиллины	Ксантофиллы	Каротин
Простые тела			
Сера (S) серный цвет	+△	+	—
„ кристаллическая	+	+	—
Кремний (Si)	+	+	—
Магний (Mg)	+		
Алюминий (Al)	+	+	—
Железо (Fe)	+	+	—
Цинк (Zn)	+	+	—
Свинец (Pb)	+		
Сурьма (Sb)	+	+	+
Окислы простых тел			
Пятиокись фосфора P_2O_5	+△	+	+
Двуокись кремния SiO_2	+	+	+
Окись магния MgO	+	+	+

Продолжение

Наименование адсорбента	Хлоро-филлины	Ксанто-филлы	Каро-тин
Окись алюминия Al_2O_3	+	+	—
Окись железа Fe_2O_3	+	+	+
Двуокись марганца MnO_2	+Δ	+☊	+☊
Окись цинка ZnO	+	+	+
Окись свинца PbO	+	+	+
Окись серебра Ag_2O	+	+	—
Окись ртути HgO	+		
Окись закиси урана U_2O_8	+☊	+☊	+☊
Гидраты окисей простых тел			
Гидрат окиси натрия, едкий натр NaOH . .	+Δ	+	—
Гидрат окиси бария $Ba(OH)_2$	+Δ	+	—
Натристая известь $[Ca(OH)_2+NaOH]$	+Δ	+	—
Гидрат окиси алюминия $Al_2H_2O_4$?	+	+	—
Гидрат триокиси бора (борная кислота) H_3BO_3	+	+	—
Соли галоидных кислот			
Хлористый аммоний NH_4Cl	+		
„ натрий NaCl	+	+	—
„ калий KCl (высушенный при 180°)	+	+	—
„ кальций $CaCl_2$ (безводный)	+	+	+
„ магний $MgCl_2+6aq$	+Δ		
„ барий $BaCl_2+2aq$	+Δ		
„ алюминий Al_2Cl_6+12aq	+Δ	+	+
Хлористое железо (закись) $FeCl_2+4aq$	+Δ	+☊	+☊
Хлористая медь $CuCl_2+2aq$	+Δ	+☊	+☊
Хлористый кобальт $CoCl_2+6aq$	+Δ	+☊	+☊
Хлористая ртуть $HgCl_2$	+Δ	+	+
Хлорноватый калий $KClO_3$	+	+	—
„ барий $Ba(ClO_3)^2+aq$	+	+	—
Бромистый калий KBr	+	+	—
Иодноватый „ KIO_3 (высушенный при 180°)	+	+	—
Иодистая ртуть HgI_2	+		

Продолжение

Наименование адсорбента	Хлорофиллины	Ксантофиллы	Каротин
Соли азотной и азотистой кислот			
Азотнокисл. калий KNO_2	+	+	—
„ кальций $Ca(NO_3)_2+4aq$	+Δ		
„ „ безводный	+	+	—
„ барий $Ba(NO_3)_2$	+	+	—
„ свинец $Pb(NO_3)_2$ (высуш. при 180°)	+	+	—
„ серебро $AgNO_3$	+Δ		
„ уранил $UO_2(NO_3)_2+6aq$	+Δ	+Ω	+Ω
Азотистокислый калий KNO_2 (высушенный в эксиккаторе)	+	+	—
Соли фосфорной и молибденовой кислот			
Трехосновный фосфорнокислый аммоний $(NH^4)^3PO_4$	+	+	—
ноосновный фосфорнокислый калий KH_2PO_4	+Δ	·+	—
Двуосновный фосфорнокислый калий KH_2PO_4	+	+	—
Одноосновный фосфорнокислый натрий NaH_2PO_4+4aq	+Δ	+	—
Нормальный фосфорнокислый кальций $Ca_3(PO_4)^2$	+	+	—
Нормальное фосфорнокислое железо $Fe_2(PO_4)^2+4aq$	+Δ	+	—
Гептамолибдат аммония $Mo_7O_{24}(NH_4)^6+4aq$.	+Δ	+	—
Соли кислот серы			
Сернистый калий K_2S	+	+	—
Сернистая ртуть HgS	+	+	+
Серноватистокислый натрий, нормальн. Na_2SO_3+7aq	+	+	—
Серноватистокислый натрий, одноосновный $NaHSO_3$	+	+	+
Сернокисл. аммоний $(NH_4)^2SO_4$	+		
„ калий K_2SO_4	+Δ	+	—
„ кальций $CaSO_4+2aq$	+Δ	+	—

Продолжение

Наименование адсорбента	Хлоро-филлины	Ксанто-филлы	Каро-тин
Сернокисл. кальций безводный	+	+	—
» магний, безводный $MgSO_4$	+Δ	+	+
» барий $BaSO_4$	+Δ	+♀	+♀
» железо $FeSO_4+7aq$	+Δ		
Сернокисл. железо безводное (высуш. при 180°)	+Δ	+	+
» марганец $MnSO_4+7aq$	+Δ	+♀	+♀
» цинк $ZnSO_4+7aq$	+Δ		
» медь $CuSO_4+5aq$	+Δ	+	+
» » безводная	+Δ	+♀	+♀
Аммонийно-сернокислая медь $CuSO_4+$ $+4NH_3+aq$	+	+	—
Марганцевокислый калий $KMnO_4$	+♀	+♀	—
Железистосинеродистый калий $K_6Fe_2Cy_{12}$ (красная синильная соль)	+Δ	+♀	+♀
Железосинеродистый калий K_4FeCy_6+3aq	+	+	—
Соли углекислоты			
Углекислый натрий, безводный Na_2CO_3	+	+	+
» калий » K_2CO_3	+	+	+
» кальций $CaCO_3$	+	+	—
» магний (основной) $Mg_4(CO_3)^3$-H_2O_2+ $+3aq$	+	+	—
Углекислое железо (соль закиси) $FeCO_3$	+Δ	+	+
» медь $CuCo_3+Cu(OH)^2$	+Δ	+	+
Соли кремнекислоты			
Кремнекислый калий K_2SiO_3 (высушенный)	+	+	—
Асбест	+		
Органические кислоты			
Кислота щавелевая (+aq)	+Δ	+	+
» винная (+aq)	+Δ	+	—
» лимонная (+aq)	+Δ	+	—
» пирогалловая	+Δ	+	—
» мочевая	+Δ	+	—
» хинная	+Δ	+	—
» пикриновая	+Δ	+	—
» дубильная	+Δ	+	—

Продолжение

Наименование адсорбента	Хлоро-филлины	Ксанто-филлы	Каро-тин
Соли органических кислот			
Щавелевокислый аммоний	+Δ	—	—
„ марганец	+Δ	+☊	+☊
Уксуснокислый свинец	+Δ	+	—
Уксуснокислая медь (+aq)	+Δ	+	—
Многоатомные спирты			
Маннит	+	+	—
Дульцит	+	+	—
Углеводы			
Сахароза	+	+	—
Галактоза	+	+	—
Инулин	+	+	—
Декстрин	+	+	—
Крахмал	+	+	—
Целлюлоза (фильтровальная бумага)	+	+	—
Алдегиды			
Триоксиметилен	+	+	—
Хлорал-гидрат	+Δ	+	—
Амидные тела			
Мочевина	+	+	—
Аспарагин (суксинаминосуксиновая кислота) .	+Δ	+	—
Производные бензола			
Гидрохинон	+	+	—
Резорцин	+	+	—
Фенол-фталеин	+Δ	+	—
Резорцин-фталеин (флюоресцин)	+Δ	+	—
Белковые вещества			
Яичный белок	+	+	—

Окончание

Наименование адсорбента	Хлорофиллины	Ксантофиллы	Каротин
Пептон	+	+	—
Гемоглобин	+		
Глюкозиды, алкалоиды			
Салицин	+	+	—
Хинин	+	+	—
Разные			
Кармин	+	+	—
Хризоидин	+	+	—
Генциана-фиолет	+	+	—
Костяной уголь	+	+	+
Кровяной уголь	+	+	+
Стеклянная вата	+		
Триппель	+	+	+
Наждак	+		
Огородная земля (высушенная)	+	+	+
Вода	+	+	—

Адсорбция водою. Особенный интерес представляют явления адсорбции хлорофилловых пигментов на границе *жидкого* адсорбента, воды.

Из листьев глухой крапивы (Lamium album) был приготовлен, посредством растирания их в петролейном эфире с примесью спирта, хлорофилловый раствор. Раствор этот был подвергнут встряхиванию с равным объемом 80-процентного спирта.

Желтая спиртовая фаза была снята посредством пипетки и петролейно-эфирный слой вторично подвергнут встряхиванию со спиртом. После этого зеленая петролейно-эфирная жидкость встряхивалась с возобновляемыми порциями дес-

тиллированной воды. После двух уже таких промывок спирт настолько удаляется из раствора, что могут обнаружиться адсорбционные явления. При дальнейшем энергичном встряхивании с водой, в пробирном цилиндре образуется на границе обеих жидкостей эмульсия, окрашенная в зеленый цвет, между тем как петролейный эфир всплывает сначала чисто желтым, и только по мере разрешения эмульсии принимает вновь зеленый цвет. Желтый раствор, выделяющийся в первый момент, представляет спектр *каротина.*

Следовательно, хлорофиллины адсорбируются на поверхности воды; эмульгирование последней в петролейном эфире чрезвычайно увеличивает площадь соприкосновения обеих жидкостей и создает таким образом условие для полного поглощения адсорбируемых пигментов. Для удачи опыта требуется, само собою понятно, чтобы раствор хлорофилла не был слишком густ; он должен иметь в обыкновенной пробирке светлозеленую окраску.

Опыт можно производить и с цельным петролейно-эфирным раствором хлорофилла. Но тогда при первых встряхиваниях с водою образуется зеленоватая, очень медленно разрешающаяся эмульсия, обусловленная присутствием особого бесцветного коллоидального спутника хлорофилла. Эмульсию можно удалять посредством центрифугирования. Подвергая зеленый раствор многократным энергичным взбалтываниям с водою и каждый раз удаляя образовавшуюся постоянную эмульсию, удается извлечь из раствора данное вещество в целости, и тогда, как было указано выше, обнаруживается адсорбция хлорофиллинов в чистом виде. При встряхивании петролейно-эфирного раствора хлорофилла с 80%-ным спиртом упомянутый коллоидальный спутник почти целиком переходит в спиртовую фазу, почему в очищенном таким образом петролейно-эфирном растворе при эмульгировании с водою адсорбция хлорофиллинов обнаруживается сразу. Опыты с цельными растворами хлоро-

филла были произведены над вытяжкой листьев тисса (Taxus baccata).

Адсорбция из сероуглеродных бензольных, и некоторых других растворов. Адсорбция хлорофилловых пигментов получается не только в петролейном эфире и других нефтяных углеводородах (пентан, бензин), но и в некоторых иных органических растворителях: сероуглерод, четыреххлористый углерод, бензол, ксилол, толуол.

Из *сероуглеродных* растворов адсорбируются сполна углекислой известью, инулином или сахаром все пигменты, за исключением каротина. Величина адсорбции, впрочем, меньше, чем в петролейно-эфирном растворе, как видно уже из того, что сероуглерод отчасти извлекает из адсорбента пигменты, поглощенные последним из петролейного эфира.

Из *бензольных* растворов углекислым кальцием или инулином адсорбируются сполна только хлорофиллины и один из ксантофиллов (β), остальные же ксантофиллы, хотя конденсируются на поверхности адсорбентов, но с явным образованием равновесной фазы в свободной массе растворителя. Вследствие этого они могут быть вполне извлечены из адсорбента путем повторного промывания чистым растворителем.

К числу органических растворителей, в которых не происходит адсорбционного осаждения хлорофилловых пигментов и которые, следовательно, извлекают последние из адсорбционного соединения, оказались принадлежащими, кроме этилового, спирт метиловый и амиловый, этиловый эфир, ацетон, хлороформ, бромоформ, салициловый алдегид, креозот, анилин, скипидар, касторовое масло, пиридин, уксусная кислота.

Незначительная примесь спирта, эфира, уксусной кислоты к растворителям первой категории (углеводороды, CS_2, CCl_4) делает последние непригодными для адсорбционного осаждения. Уксусная кислота, кроме того, изменяет хлорофиллины.

Явления адсорбционного замещения

Мы видели выше, что из петролейно-эфирного раствора хлорофилла некоторые пигменты поглощаются порошкообразными веществами до известного предела *сполна,* т. е. без видимого равновесного распределения между поверхностью адсорбента и свободной массой растворителя. Применяя термин, предложенный Van Bemmelen'ом, мы можем говорить об образовании *адсорбционных соединений* между адсорбентом и поглощаемыми веществами. Понятие это можно распространить и на те случаи, когда растворенное вещество распределяется в известной пропорции между растворителем и адсорбентом. Мы будем говорить тогда о *диссоциирующем адсорбционном соединении.* Так, например, ксантофилл α, как увидим впоследствии, образует с углекислой известью адсорбционное соединение, не диссоциирующее в петролейном эфире, слабо диссоциирующее в бензоле и совершенно диссоциирующее в спирте или эфире.

Следует оговориться, что совершенно недиссоциирующих адсорбционных соединений, равно как и совершенно недиссоциирующих химических соединений и совершенно нерастворимых или нелетучих веществ (Zenghelis), по всей вероятности, не существует; а потому *полная* адсорбция в действительности отличается от неполной только тем, что соотношение концентрации адсорбируемого вещества на поверхности адсорбента к концентрации его, в массе растворителя очень значительно: настолько, что, в то время когда вещество, скажем пигмент, легко обнаруживается на адсорбенте, в растворе оно ускользает от спектроскопического или флюороскопического контроля.

Адсорбируемые вещества способны вытеснять друг друга из своих адсорбционных соединений. Подобные явления адсорбционного замещения уже были отмечены некоторыми исследователями (см. стр. 92) для минеральных солей и кислот,

а также для чистых растворителей. В следующих же моих опытах они выступают вполне наглядно и отчетливо, не усложняясь никакими химическими факторами.

В пробирный цилиндр вводится немного порошка углекислого кальция или инулина и несколько кубических сантиметров петролейного эфира. Смесь встряхивается и подвергается центрифугированию. На дне пробирки имеется теперь плотный слой порошка, пропитанный петролейным эфиром. Всплывающий избыток последнего сливается и заменяется петролейно-эфирным раствором хлорофилла. Немедленно поверхностный слой порошка принимает густую окраску, сперва однородно зеленую, потом постепенно расслаивающуюся на несколько ярусов: на самой поверхности бледнозеленый, почти бесцветный слой, затем желто-зеленый, зеленосиний и желтый слои. Каждый из названных слоев становится постепенно толще и толще, причем, понятно, границы их отодвигаются все ниже и ниже, в глубь порошка. Одновременно с этим раствор над адсорбентом понемногу бледнеет и принимает, наконец, чисто желтую окраску.[1] В одном опыте (с углекислым кальцием) нижние границы слоев проникли в течение суток на следующие глубины (в мм):

поверхностный, бесцветный слой	1
зелено-синий слой	$1^1/_2$
желтый слой	2

Гораздо быстрее происходит проникновение и расслаивание хлорофилла, если его раствор пропускать под давлением через столб адсорбента, заключенный в узкую, открытую снизу трубку. В трубочках, применяемых мною для адсорбционного анализа небольших количеств хлорофилла (см. следующую главу), уже через несколько минут рас-

[1] Эта окраска обусловлена каротином, который, как мы видели, не подлежит адсорбционному поглощению.

слоение становится доступным невооруженному глазу и измерению. Из нижнего конца трубки вытекает желтый раствор неадсорбируемого и потому проходящего насквозь каротина.

Если пропускать через окрашенный вышеупомянутым путем столбик адсорбента ток чистого петролейного эфира, то отдельные слои еще немного расширяются и границы их становятся отчетливее. Нижний желтый слой, во время фильтрации несколько смешивающийся с предыдущими, совершенно обособляется, опускаясь вниз, и притом расслаивается на два яруса не совсем одинаковой окраски. Верхний слой становится бесцветным, третий, сине-зеленый, приобретает зеленовато-синюю окраску.

Вместо петролейного эфира можно пропускать через препарат ток сероуглерода; полное расслаивание, окончательная дифференциация происходят тогда быстрее. Все слои при этом значительно расширяются, и на границе между верхним бесцветным слоем и желто-зеленым отчетливо вырисовывается желтая полоска. Внизу же препарата два желтых слоя являются разделенными узкой бесцветной полоской.

В начале пропускания тока, в верхней quasi бесцветной зоне появляется зеленоватая, окаймленная снизу желтым цветом волна, которая вместе с растворителем опускается вниз и распределяется в остальных слоях. Верхний слой становится теперь совершенно бесцветным.

Еще большее распространение слоев вызывает ток бензола. Нижние желтые слои при этом медленно передвигаются вниз, и верхний из них разбивается на два. При небольшой высоте адсорбционного столбика и достаточно продолжительном пропускании бензола, названные желтые слои могут быть совершенно вымыты из прибора и каждый из них собран отдельно в виде бензольного раствора. Если во время нисходящего передвижения желтых слоев переменить направление тока бензола, то и желтые слои передви-

гаются, соответственно и, переходя через верхние слои, вымываются из препарата.

Подобное же расслаивание пигментов наблюдается при фильтровании через столб адсорбента сероуглеродного или бензольного раствора хлорофилла. Бензольный раствор дает нижние желтые слои очень бледные, расплывчатые.

Причина изученного выше явления расслаивания хлорофилла на различно окрашенные зоны кроется во взаимодействии многочисленных составных этого пигмента, существование которых моими опытами доказывается убедительнейшим образом. Получаемые слои можно, как будет изложено впоследствии, отделить друг от друга и извлечь спиртом или эфиром. Каждый из них содержит особый пигмент, легко характеризуемый спектроскопическими свойствами. Каждый пигмент, будучи растворен в петролейном эфире или сероуглероде, подвергается полному адсорбционному поглощению порошкообразными веществами, в частности углекислым кальцием. Если в смешанном растворе, при пропускании последнего через столб адсорбента, пигменты отлагаются не совместно, а обособленными слоями, при передвижении которых происходит поочередно поглощение и освобождение каждого пигмента, то следует предположить, что эти пигменты, и вообще всякие адсорбируемые вещества, способны вытеснять друг друга из адсорбционного соединения в определенном порядке. Вещества, растворенные в определенной жидкости, образуют определенный *адсорбционный ряд A. B. C. . . . . .*, выражающий относительное *адсорбционное сродство* его членов к адсорбенту. Каждый из членов адсорбционного ряда, обладая бо̀льшим адсорбционным сродством, чем последующий, вытесняет его из соединения и в свою очередь вытесняется предыдущим.

Поэтому, из смешанного раствора вещества *A. B. C. . .* при достаточно продолжительном соприкосновении с небольшим количеством адсорбента будет удерживаться только

обладающее наибольшим адсорбционным сродством вещество *A*. Если адсорбент был взят в количестве, ровно достаточном для того, чтобы поглотить вещество *A*, то при дальнейшем прибавлении адсорбента будет поглощаться следующее в ряду адсорбционного сродства вещество *B* и т. д. Пропускание раствора $A+B+C+\ldots$ через столб адсорбента равносильно вышеописанной фракционированной адсорбции, с той особенностью, что, ввиду ничтожных размеров капиллярных пространств, существующих между крупинками адсорбента, адсорбционное равновесие устанавливается быстро. Раствор, лишаясь вещества *A* в первых же слоях адсорбента, поступает дальше и отлагает вещество *B*, затем *C* и т. д. Расслоение начинается, разумеется, при прохождении следующего „элементарного" объема раствора. При прохождении следующего элементарного объема вводимое вещество *A* вытесняет часть *B*, увеличивая толщину слоя адсорбента, занятого веществом *A*. В свою очередь, освобождающееся, равно как и вновь притекающее вещество *B*, вытесняет *C* из-под существующего уже слоя адсорбента, насыщенного *B*. Таким образом различные зоны растут, увеличиваясь в толщине и передвигая свои границы. Зональное распределение составных раствора выражает относительное положение последних в адсорбционном ряду.

Для проверки только что выведенного закона были поставлены следующие опыты.

По методам, изложенным во второй части настоящего труда, были приготовлены петролейно-эфирные растворы: 1) хлорофиллина α, 2) хлорофиллинов $\alpha+\beta$, 3) ксантофилла α. Пигменты эти располагаются в адсорбционном ряду следующим образом: хлорофиллин β, хлорофиллин α и, наконец — ксантофилл α. При фильтрации раствора хлорофиллина α через столб углекислого кальция адсорбент окрашивается до известной глубины в сине-зеленый цвет; при

пропускании затем тока раствора ксантофилла α последний пигмент проходит, не поглощаясь, через окрашенный хлорофиллином слой и отлагается под ним, образуя желтую зону. Если пропускать растворы в обратном порядке, то образовавшийся на поверхности слой ксантофилла, тотчас по проникновении в него хлорофиллина, начинает опускаться, его же место занимает хлорофиллин.

Следовательно, ксантофилл вытесняется хлорофиллином, но его вытеснять не может. То же самое доказывают опыты встряхивания в пробирном цилиндре адсорбента с растворами пигментов. Адсорбент насыщался хлорофиллином или смесью обоих хлорофиллинов посредством встряхивания с избытком раствора, отстаивания (на центрифуге) и промывания чистым петролейным эфиром. Когда последний всплывал бесцветным, к нему доливалось немного раствора ксантофилла, и содержимое пробирки энергично встряхивалось. После отстаивания растворитель всплывал бесцветным.

При встряхивании с новыми порциями ксантофилла последний уже не поглощался: растворитель всплывал желтым, без всяких следов флюоресценции или спектральных полос хлорофиллинов. Данный опыт показывает опять, что ксантофилл не способен вытеснять хлорофиллинов из их адсорбционных соединений.

При встряхивании насыщенного ксантофиллом адсорбента с раствором хлорофиллина происходит немедленно освобождение первого пигмента и поглощение последнего. Растворитель всплывает желтым. Данные опыты показывают, следовательно, опять, что в петролейно-эфирном растворе хлорофиллины вытесняют ксантофилл из адсорбционного соединения, но не обратно. Вытеснение это не полное, о чем свидетельствует способность адсорбента, насыщенного хлорофиллином, поглощать еще немного ксантофилла. Точно так же при вытеснении ксантофилла в присутствии избытка хлорофиллина в адсорбате можно обнаружить следы ксан-

тофилла. Для этого промытый петролейным эфиром адсорбент извлекается спиртом, к раствору прибавляется немного едкого калия, и, после нагревания, имеющего целью ускорить превращение хлорофиллина в нерастворимое в эфире производное, жидкость разбавляется водой и встряхивается с эфиром. Последний всплывает желтым, унося оставшиеся в адсорбате следы ксантофилла.

Описанные опыты производились с разведенными растворами пигментов, процентное содержание которых, к сожалению, еще нельзя определить.

Может ли ксантофилл при большом избытке (в концентрации) вытеснять отчасти хлорофиллин или хлорофиллин совершенно вытеснять ксантофилл — это вопрос еще открытый, для практического применения изучаемых явлений несущественный.

Из предыдущего следует, что адсорбент, насыщенный одним веществом, может удержать еще некоторое количество вещества, обладающего меньшим адсорбционным сродством. Поэтому возникающие при фильтрации через адсорбент смешанного раствора отдельные слои должны или могут быть загрязнены следами веществ, принадлежащих к следующим слоям, и пропускание через препарат чистого растворителя не может привести к полной сегрегации отдельных веществ.

Исследование слоев, получаемых непосредственно при фильтрации петролейно-эфирного раствора хлорофилла через углекислый кальций, подтверждает этот вывод.

Миграция адсорбата в адсорбенте под влиянием тока растворителя. Вышеприведенные соображения относятся к случаю практически не диссоциирующих в данном растворителе адсорбционных соединений.

Иначе обстоит дело при фильтрации хлорофилла, растворенного в жидкости, из которой пигменты не адсорби-

руются сполна. Этот случай особенно важен и заслуживает подробного разбора.

Сказать, что растворенное вещество, положим пигмент, не адсорбируется сполна, равносильно утверждению, что коэффициент адсорбции $\frac{C^a}{C^s}$ (где C^a — концентрация вещества в граничащем с адсорбентом слое жидкости, а C^s — концентрация его в массе растворителя) не есть очень малая величина при том порядке значений C^a, когда пигмент доступен прямому или спектроскопическому наблюдению.

Последняя оговорка необходима, так как в силу уравнения $C^a = \beta (C^s)^{\frac{1}{p}}$ коэффициент $\frac{C^a}{C^s}$ может теоретически принимать всевозможные величины,[1] в зависимости от значения C^a.

Рассмотрим сперва процесс адсорбционного отложения вещества при пропускании его раствора сквозь столб адсорбента.

Чтобы не осложнять рассуждения соображениями о капиллярном слое растворителя, задерживаемом на поверхности частиц адсорбента, представим себе последний предварительно пропитанным растворителем.

Первый, бесконечно тонкий слой раствора, фильтруясь через первый, таковой же слой адсорбента, оставляет в нем часть растворенного вещества, причем его первоначальная концентрация $\frac{a^\circ}{v}$ падает до $\frac{a}{v}$ (v = объем). Адсорбированным остается количество x вещества, определяемое фор-

---

[1] Положим, например, $C^a = 10$, $C^s = 1$ и $\frac{1}{p} = 0{,}2$ (сравн. стр. 90). По указанной формуле получим для $C^a = 1$ соответствующую равновесную $C^s = 10^{-5}$, т. е. коэффициент адсорбции, который при $C^a = 10$ равнялся 10, при $C^a = 1$ равняется 100 000, а потому адсорбция может казаться теперь полною.

мулой $\frac{x}{m} = \beta \left(\frac{a}{v}\right)^{\frac{1}{p}}$, где m — масса адсорбента, величина пропорциональная объему капиллярного слоя растворителя на адсорбенте, а β и $\frac{1}{p}$ — постоянные (см. стр. 88).

Поступающий во второй слой адсорбента первый слой раствора вновь отдает часть растворенного в нем вещества, а именно: количество $x' < x$, причем соотношение равновесных концентраций $\frac{x'/m}{a'/v} > \frac{x/m}{a/v}$.

Если примерно $\frac{x}{a} = 10$, то очевидно, что поглощение вещества станет практически совершенным по прохождении нескольких слов адсорбента.

Проследим теперь судьбу второго слоя раствора. При прохождении через первый слой адсорбента он должен отдать часть растворенного в нем вещества, но в пропорции, очевидно меньшей, чем первый слой раствора. Вообще каждый новый слой раствора, проходящий через первый слой адсорбента, будет отдавать ему часть растворенного вещества, до тех пор, пока общее количество x адсорбированного вещества не достигнет величины, равновесной с концентрацией $\frac{a^\circ}{v}$ испытуемого раствора. Соотношение этой предельной величины x к первоначально (при фильтрации первого слоя) адсорбированному количеству x определяется из уравнения

$$\frac{X}{x} = \left(\frac{a^\circ}{a}\right)^{\frac{1}{p}} = \left(\frac{a^\circ}{a^\circ - x}\right)^{\frac{1}{p}}.$$

Если положить $a^\circ = 10$, $x = 9$ и $\frac{1}{p} = 0{,}2$, то получается $\frac{X}{x} = 1{,}584$.

После достижения в первом слое адсорбента названной предельной адсорбционной концентрации X/m раствор будет

проходить через этот слой неизменным, обогащая следующие слои, пока в них не установится та же концентрация, что и в первом.

Следовательно, при фильтрации пигментного раствора через столб адсорбента, последний будет постепенно и равномерно окрашиваться вглубь, причем нижняя граница окрашенного пласта будет тем резче, чем быстрее падение адсорбционной концентрации от предельной величины $\frac{x}{m}$ до величины $\frac{1}{\infty}$, что зависит как от величины адсорбционного коэффициента, так и от значения постоянной $\frac{1}{p}$.

Если теперь через окрашенный в своей верхней части столб адсорбента мы будем пропускать ток чистого растворителя, то произойдет следующее: первый слой жидкости, проходя через последовательные слои окрашенного адсорбента, будет отнимать часть поглощенного в них пигмента, согласно неоднократно уже упомянутой изотерме адсорбционного равновесия, причем концентрация раствора будет постепенно увеличиваться, приближаясь к предельной величине $\frac{a^\circ}{v}$, равновесной господствующей в адсорбате адсорбционной концентрации $\frac{X}{m}$. С этой максимальной концентрацей $< a^\circ/v$ жидкость будет фильтроваться дальше, пока она не выйдет из области адсорбционной концентрации X/m, т. е. до нижней границы адсорбата, где она отложит растворенный в ней пигмент. Такова же будет судьба второго и последующих слоев проходящего через адсорбат чистого растворителя.

Следовательно, пигмент будет постепенно вымываться на верхней границе окрашенного пласта адсорбента и отлагаться на нижней границе: *масса адсорбата будет медленно передвигаться по направлению тока чистого растворителя.* При этом ширина зоны адсорбента, занимаемой адсорбатом, будет постепенно увеличиваться, в связи с постепенным па-

дением в нем адсорбционной концентрации C^a. Действительно, каждый проходящий сквозь адсорбент слой растворителя обедняет все последующие слои, включая тот, адсорбционная концентрация которого является максимальной, ибо увеличение концентрации в растворе (C^s) может происходить только за счет уменьшения C^a в промываемых слоях. Скорость, с которой будет путешествовать адсорбат определенного вещества, очевидно, зависит от величин адсорбционных постоянных β и $\frac{1}{p}$, уменьшаясь вместе с первой и увеличиваясь вместе со второй. А так как вообще различные тела будут обладать различными постоянными, то при пропускании соответствующего растворителя через столб адсорбента, насыщенного в верхней части несколькими веществами, последние будут, помимо явлений вытеснения, передвигаться с различною скоростью и потому *постепенно отделяться в виде самостоятельных адсорбционных зон.*

Вышеприведенные предсказания, выведенные из основного закона адсорбционного равновесия, подтверждаются при наблюдении фильтрации через столб углекислого кальция сероуглеродных или бензольных растворов отдельных или смешанных пигментов хлорофилла.

В последнем случае, т. е. при смеси пигментов, происходит, на основании установленного нами закона замещения, расслаивание пигментов, а следующая затем фильтрация чистого растворителя завершает процесс отделения, причиняя неравномерное передвижение отдельных веществ, в виде независимых зон. Особенно быстро передвигается зона ксантофилла α, затем зоны ксантофиллов α' α'', которые были сначала смешаны или соприкасались, но при передвижении обособляются. Отсюда можно вывести заключение, что вообще расположение веществ по скорости адсорбционной миграции их совпадает с рядом адсорбционного замещения.

Правило это, теоретически пока не обоснованное, нуждается, конечно, в более широкой эмпирической проверке.

Влияние природы адсорбента на величину адсорбционного поглощения. Задачей будущего является точное количественное расследование вышеописанных явлений адсорбции с целью установить зависимость факторов адсорбции $\left(\beta \text{ и } \frac{1}{p} \text{ в уравнении Freundlich'a}\right)$ от природы адсорбента, — задачей не совсем легкой, — так как в расчет должны входить: механическое состояние адсорбента, степень его раздробленности, быть может, геометрическая форма частичек его. Но и в наличных опытах обнаружились в поглотительной силе адсорбентов крупные разницы, заслуживающие упоминания. Наиболее энергично поглощали хлорофилл: осажденный кремнезем, гидрат окиси алюминия, костяной и кровяной уголь, окись магния, безводные углекислые соли натрия и калия. Названные адсорбенты окрашиваются в петролейно-эфирном растворе хлорофилла в чрезвычайно густой зеленый цвет, причем некоторые из них, как было уже отмечено, поглощают и каротин.

Влияние на адсорбцию влажности адсорбента. Опыты, перечисленные на стр. 110 — 115, были в большинстве случаев произведены с порошкообразными адсорбентами, полученными путем размельчения веществ в ступке на открытом воздухе, вследствие чего порошок мог адсорбировать некоторое количество паров воды. Поглощаемая влага входит либо в состав адсорбента в качестве гидратной или кристаллизационной воды (обезвоженные Na_2CO_3, $CuSO_4$ и пр.), либо образует на поверхности твердого тела капиллярный, находящийся под высоким давлением слой, в котором, несомненно, растворяется некоторое количество вещества адсорбента. Наблюдаемые поэтому в опытах с влажными адсорбентами явления адсорбции нельзя рассматривать как происходящие на границе между петролейным эфиром (или

бензолом и пр.) и твердыми телами.[1] Нельзя, однако, утверждать, что вместо твердых тел мы имеем дело только с их насыщенными водными растворами. Очевидно, что если адсорбент не насыщен парами воды (см. стр. 95), т. е. если толщина образовавшегося на нем капиллярного слоя воды меньше радиуса действия молекулярных сил (134 μμ по Parks'у), то твердая фаза адсорбента будет тоже влиять на распределение веществ в граничащем петролейно-эфирном растворе.

Для иллюстрации влияния влажности адсорбента на его поглотительные свойства привожу опыты с углекислым кальцием.

Порошок, высушенный при 150° и введенный в адсорбционные трубки на воздухе, *каротина* заметно не поглощает. При фильтрации через него петролейно-эфирного раствора хлорофилла растворитель, правда, опережает несколько каротин, вытекая из адсорбционной трубки в первый момент бесцветным, но каротин в адсорбенте глазу заметно не сгущается.

Если же наполненную углекислым кальцием адсорбционную трубку подержать 1—2 часа в эксикаторе над серной кислотой, то адсорбент приобретает свойство конденсировать значительно и каротин, который, при фильтрации его чистого или смешанного (в виде хлорофилла) раствора, образует красивую розовую зону.

Состояние молекулярной аггрегации адсорбированных пигментов. Об изменении состояния молекулярной аггрегации пигментов при переходе в адсорбированную фазу можно было бы судить только на основании их спектроскопических свойств, изучая, например спектр отражения адсорбатов. Подобного исследования я не предпринимал. Указанием на изменение молекулярной аггре-

[1] Возможное предположение, что петролейный эфир вытесняет с поверхности адсорбента образовавшийся на нем слой водного раствора, ничем не обосновывается. Упомянутые на стр. 92 опыты Мюллер-Эрцбаха свидетельствуют даже противное.

гации является тот факт, что каротин, адсорбированный из петролейного эфира на углекислом кальции (сухом), безводных углекислых солях калия, натрия, на безводном хлористом кальции, на окиси магния и пр., имеет окраску розовую, а не желтую, присущую ему в соответствующем растворе.

Окраска адсорбата вообще зависит от растворителя, из которого происходит адсорбция. Так, в бензоле и особенно в сероуглероде адсорбаты хлорофиллинов имеют гораздо более густую насыщенную окраску, чем в петролейном эфире. Несомненно, в этом факте играет значительную роль большой показатель преломления сероуглерода, благодаря которому увеличивается прозрачность массы адсорбента, т. е. проникновение вглубь и отражение оттуда падающих на препарат лучей, вследствие чего отраженный свет обогащается лучами, наименее поглощаемыми пигментом.

Химическое воздействие адсорбентов. Многие из испробованных нами в качестве адсорбентов веществ оказывают на поглощаемые ими хлорофилловые пигменты химическое воздействие, обнаруживающееся даже при непродолжительном соприкосновении (несколько минут).

Наиболее часто встречаемое воздействие — кислотное, превращающее хлорофиллины в хлорофилланы, резко отличающиеся своими спектральными свойствами.

С химической точки зрения, это превращение сопровождается, как увидим впоследствии, отщеплением магния, входящего, повидимому, в состав хлорофиллинов.

Кислотное воздействие обнаружили все поименованные в списке кислоты, за исключением борной, но включая пирогаллол, резорцин, аспарагин (суксинаминовая кислота) и фенолфталеин; затем фосфорный ангидрид, все соли хлористоводородной кислоты, исключая соли щелочных металлов; все соли серной кислоты, за исключением аммиачной сернокислой меди; соли азотной кислоты, за исключением калиевой,

баритовой и безводной кальциевой; соли фосфорной кислоты, за исключением трехосновных — кальциевой и аммиачной; металлические соли органических кислот, углекислое железо, железо-синеродистый калий и серный цвет.

Таким образом, кислотное воздействие проявляют адсорбенты, вещество которых, растворяясь в капиллярном слое конденсированной на их поверхности воды, дает вследствие электролитической диссоциации и гидролитического распада на „сильную“ кислоту и „слабую“ щелочь — водородные ионы. Серный цвет, окисляясь на воздухе, дает сернистый ангидрид и поэтому в адсорбционной воде кислую реакцию, непосредственно обнаруженную уже Эмихом (Knoblauch, Emich). Неразъясненным остается пока кислотное действие красной кровяной соли. Участие гигроскопичной (может быть, и кристаллизационной) воды адсорбента в его кислотной деятельности подтверждается некоторыми опытами, где кислотно действующие соли ($Ca(NO^3)^2$, $CaCl_2$), будучи, путем сильного нагревания, совершенно лишены кристаллизационной воды, становились химически индифферентными по отношению к хлорофиллинам.

Иное химическое воздействие обнаруживают щелочные адсорбенты (едкий натр, барит). Адсорбированные хлорофиллины быстро становятся нерастворимыми в петролейном эфире, почему окрашенный адсорбент, обработанный петролейным эфиром с примесью спирта, отдает растворителю только ксантофиллы.

Третьего рода изменение — окисление — испытывают хлорофилловые пигменты при адсорбции легко отдающими кислород веществами, как перекись марганца, марганцевокислый калий, железосинеродистый калий. Окислению поддаются легче всего ксантофиллы и каротин, превращающиеся в бесцветные вещества.

Разрушающее действие на ксантофиллины оказывают тоже сернокислые соли меди, марганца; хлористоводород-

ные соли железа, меди, кобальта, азотнокислый уранил; одним словом те соли, при гидролитическом распадении которых образуется металлический гидрат окиси, могущий служить передатчиком кислорода. В действии соли урана, а тоже U_3O_8, может участвовать известная радиоактивность, свойственная урану.

Опыты над хлорофилланами и различными другими веществами

Адсорбционному поглощению подвержены, наравне с хлорофилловыми пигментами, разнообразные иные, красящие или бесцветные, вещества, растворимые в петролейном эфире, бензоле или сероуглероде.

Хлорофилланы α и β, первые продукты воздействия кислот на хлорофиллины (см. II часть), адсорбируются вполне из петролейно-эфирного или сероуглеродного раствора углекислым кальцием, инулином и пр. Бензол очень легко вымывает их из адсорбционного соединения.

В адсорбционном ряду хлорофилланы располагаются за хлорофиллинами, т. е. вытесняются ими из адсорбционного соединения.

В этом легко убедиться, пропуская через столб углекислого кальция петролейно-эфирный раствор хлорофилла, отчасти измененного действием кислот. Адсорбционные зоны хлорофилланов располагаются по направлению тока внизу, причем между ними помещается зона ксантофилла α. При пропускании через препарат тока сероуглерода (причем все зоны расширяются и опускаются вниз), желто-серая зона хлорофиллана β проходит через зону ксантофилла и занимает место между последним и синевато-серым слоем хлорофиллана α. Последнее расположение зон получается непосредственно при фильтрации сероуглеродного раствора смешанного пигмента.

Из этих наблюдений следует, что адсорбционный ряд зависит от природы растворителя.

Бензол, пропускаемый через адсорбционный препарат, который получен из петролейно-эфирного раствора, быстро вымывает вон зоны хлорофилланов. При фильтрации бензольного раствора хлорофилланов через столб углекислого кальция пигменты не образуют заметных глазу адсорбционных зон, следовательно, конденсируются на данном адсорбенте очень слабо.

Родоксантин. Как будет изложено во II части настоящего труда, красно-бурая окраска, приобретаемая листьями туи (Thuja) (и некоторых других хвойных) зимой на экспонированной свету стороне, обусловлена главным образом появлением особого пигмента из группы ксантофиллинов. Этот пигмент, для которого предлагаю название *родоксантина*, обладает в твердом и адсорбированном виде красно-лиловым цветом; спиртовой раствор его розовый, а петролейно-эфирный — желтый. При фильтрации петролейно-эфирного экстракта листьев туи через столб углекислого кальция родоксантин обнаруживается в виде лилово-розового слоя под ксантофиллом α.

Солянорубин (ликопин), красный пигмент плодов томата (по Montanari (04) — углеводород), извлекается из выжатой мякоти плода, растираемой с петролейным эфиром; адсорбируется из получаемого раствора углекислым кальцием в розовом цвете, а окисью магния в красном.

Продигиозин, красный пигмент, извлеченный спиртом из культуры Bacillus prodigiosus и переведенный в петролейный эфир, вполне адсорбируется из последнего растворителя углекислым кальцием.

Лютеин, желтый пигмент (вероятно, смесь) яичного желтка. Для получения его в несколько очищенном виде желток был извлечен ацетоном, к раствору прибавлен спиртовой раствор KOH, смесь эта кипятилась 2 часа с обратным

холодильником; затем по разбавлении водою, пигмент переведен в петролейный эфир. Полученный раствор был выпарен in vacuo, и остающаяся маслянистая масса вновь растворена в петролейном эфире, откуда пигмент вполне адсорбировался инулином. После прибавления к растворителю немного спирта пигмент вновь перешел в раствор.

Цианин, хинолеиновая синь $C_{30}H_{39}N_4I$ (препарат Grübler'a), трудно растворим в этиловом и в петролейном эфире, но легко растворяется в спирте, бензоле и сероуглероде. Из бензольного раствора вполне поглощается углекислым кальцием, сернокислым кальцием, углекислым натрием, окисью свинца, винной кислотою. Прибавление спирта к растворителю освобождает адсорбат.

Альканин в петролейно-эфирном растворе не поглощается углекислым кальцием, но вполне адсорбируется окисью свинца и безводным хлористым кальцием.

Судан III (препарат Grübler'a) растворяется в петролейном эфире с красным цветом. При фильтрации раствора через столб $CaCO_3$ образуются три различно окрашенные зоны: фиолетовая, розово-фиолетовая и розово-оранжевая. При пропускании через препарат чистого петролейного эфира третья зона быстро отмывается, между тем как зоны первая и вторая медленно передвигаются. Следовательно, препарат представляет собой смесь нескольких пигментов, доступных отделению посредством адсорбции.

Судан IV (препарат неизвестного происхождения, полученный от Штоль и Шмидта в Петербурге). При фильтрации на $CaCO_3$ петролейно-эфирного раствора возникают зоны, окрашенные подобно первой и второй судана III и, кроме того, особая желтая зона.

Пикриновая кислота растворяется в бензоле и адсорбируется из последнего на $CaCO_3$ в интенсивно желтом цвете, причем, очевидно, должно происходить образование пикрата кальция.

„*Fettblau*“ — препарат Merck'a, эмульгируется, но не растворяется в петролейном эфире, хорошо растворяется в бензоле. При фильтрации бензольного раствора через столб $CaCO_3$ образуются две адсорбционные зоны: I фиолетовая, II синяя. Следовательно, препарат представляет собой смесь пигментов.

Лецитин куриного яйца. Опыт был произведен следующим образом. Желток свежего яйца был взболтан вместе с петролейным эфиром, к которому была примешана десятая часть спирта. Получился зернистый осадок и прозрачная желтая жидкость, которая была отлита, выпарена на водяной бане в безвоздушном пространстве, и маслянистый остаток растворен в чистом петролейном эфире.

Несколько кубических сантиметров полученного раствора были пропущены через столб инулина. Жидкость вытекала сначала бесцветной, потом желтой и содержала много жирного вещества. Через столб инулина долго пропускался ток чистого петролейного эфира, пока жидкость не перестала вытекать желтой и давать при испарении капли на шелковой бумаге жирное прозрачное пятно. Тогда через фильтр был пущен ток петролейного эфира с примесью спирта. Из прибора стал вытекать бледножелтый раствор, сухим остатком которого оказалось воскообразное вещество, обладающее двойным преломлением, разбухающее в воде при образовании миелитических форм и разжижающееся в концентрированном водном растворе резорцина, одним словом, представляющее характерный для лецитина комплекс свойств.

Опыт этот показывает, что лецитин адсорбируется из петролейно-эфирного раствора и что этим свойством можно воспользоваться для отделения его от обыкновенно сопутствующих ему жировых веществ.

Теоретические соображения

Изложенные в настоящей главе явления относятся с полной очевидностью к категории той истинной физической адсорбции, существование которой установлено Гиббсом на основании термодинамических рассуждений. И наши опыты дают, кажется, наиболее наглядный и бесспорный пример этой адсорбции. Исследуемые нами среды: нефтяные углеводороды, сероуглерод, бензол — допускают применение разнообразнейших адсорбентов.

Разнообразие же последних и химическая индифферентность исследованных пигментов (хлорофиллины, хлорофилланы, ксантофиллы, каротин), быстрота поглощения и его обратимость исключают возможность химического толкования наблюдаемых явлений. Остается, правда, невыясненным: применима ли здесь общая эмпирическая формула адсорбционного равновесия (см. выше стр. 88). Во всяком случае, и здесь адсорбционный коэффициент $\frac{C^a}{C^s}$ не есть постоянная, а увеличивается вместе с падающим C^s, следствием чего наблюдается, в известных пределах, полная адсорбция.

Теория, по которой адсорбированное вещество растворяется адсорбентом, опровергается всего ярче тем фактом, что хлорофиллины, вещества совсем не растворимые в воде, адсорбируются ею.

Исследованные нами явления адсорбционного замещения, столь наглядно проявляющиеся при фильтрации растворов хлорофилла через столб адсорбента, представляются необходимым короллярием термодинамической теории адсорбции, на который не было обращено доселе должного внимания. В чистом, неосложненном виде, они могут проявляться только в том случае, когда между наличными растворенными веществами нет взаимодействия химического или в смысле образования молекулярных комплексов. Если же,

например, вещество *A*, накопляющееся на границе адсорбента и вытесняющее оттуда вещество *B*, способно ***растворять*** последнее с выделением теплоты, то нельзя, очевидно, ожидать полного вытеснения.

Наблюдаемое в наших опытах освобождение адсорбированных из петролейно-эфирного раствора веществ, путем прибавления к растворителю небольшого количества спирта, возможно толковать гипотетически, как явление адсорбционного вытеснения — предполагая именно, что спирт более понижает поверхностное натяжение на границе между петролейным эфиром и адсорбентом, чем это совершают хлорофилловые пигменты. Во всяком случае упомянутое освобождение адсорбированных пигментов не обусловлено увеличением растворимости их в петролейном эфире после прибавления спирта, так как освобождается одинаково и адсорбированный каротин, вещество более растворимое в петролейном эфире, чем в спирте.

Мы говорили уже, что термодинамическая теория адсорбции, исходя из соображений об изменениях поверхностной энергии и оставляя совсем в стороне суть этой энергии и причинность ее изменений, не дает полного, действительного объяснения адсорбционных явлений. Такое объяснение могла бы дать только молекулярно-кинетическая теория материи, основанная либо на ньютоновском тяготении, либо на центральных силах электро-динамического или электронического притяжения (ср. Sutherland). К разряду таких теорий примыкает теория Lagergren'a, которая, однако, принимает в соображение лишь механическое взаимодействие между адсорбентом и растворенными веществами. Кроме того, в лягергреновской теории неравномерное распределение растворенного вещества между свободной и адсорбированной (т. е. конденсированной) фазами растворителя не получает объяснения, принимаясь в качестве эмпирической истины.

Возвращаясь к термодинамической теории, отмечу, что

поверхностное или, вернее, межповерхностное натяжение („interfacial tension“ Lewis'a), на котором она основывается, является для твердых адсорбентов величиной, недоступной измерению, почему данная теория не может иметь практического значения. Мы видели тоже, что в опытах Lewis'a с жидкими адсорбентами предсказания теории сильно расходились с действительностью.

Экспериментальные исследования последних лет над явлениями адсорбции оставили в стороне вопрос о влиянии величины радиуса кривизны адсорбирующих поверхностей на коэффициенты адсорбции. A priori такое влияние должно быть, хотя в новейших упомянутых опытах Люиса с жидкими адсорбентами оно не обнаружилось. Люис определял коэффициенты адсорбции, с одной стороны, на плоской поверхности, с другой, — на поверхности капелек жидкости, радиус кривизны которых равнялся 425 $\mu\mu$. Заметного влияния кривизны адсорбирующей поверхности можно ожидать в адсорбентах с большей степенью раздробленности, чем та, которой практически возможно достичь механическим путем. Таковы коллоидальные тела и кристаллические вещества, лишаемые кристаллизационной воды без плавления, древесный и животный уголь, где, кроме микроскопических пор, имеются, вероятно, и ультрамикроскопические (не молекулярные). Чрезвычайную поглотительную способность таких тел не следует поэтому относить целиком на счет крайне увеличенной площади адсорбирующих поверхностей.

Очевидно также, что при тесном соприкосновении хотя бы и крупных частиц порошкообразного адсорбента должны возникать изменения в коэффициенте адсорбции. Слой растворителя, находящийся между двумя смежными крупинками адсорбента, в случае если его толщина меньше двойного радиуса молекулярного действия (примерно меньше 250 $\mu\mu$), должен находиться, очевидно, под увеличенным молекулярным давлением.

Глава V

АДСОРБЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

III. Дробная адсорбция и хроматографический метод

Из исторического очерка III главы видно, что адсорбция растворенных веществ (положительная или отрицательная) — явление общее, имеющее место в каждом растворе на границе его с твердым, жидким или газообразным телом.

В предыдущей главе было показано, что положительная адсорбция особенно отчетливо проявляется для разнообразных веществ, растворенных в некоторых органических жидкостях, как-то: углеводороды алифатического и циклического рядов (пентан, петролейный эфир, бензин, бензол, ксилол), сероуглерод или четыреххлористый углерод.

Адсорбционное поглощение в некоторых случаях настолько велико, что при такой концентрации растворенного вещества (пигмента) на поверхности адсорбента, когда последний является ярко окрашенным, равновесная концентрация вещества в окружающей среде практически равна нулю. Было показано тоже, что из смешанного раствора нескольких не действующих друг на друга веществ происходит элективная адсорбция, вследствие того, что вещества способны вытеснять друг друга с поверхности адсорбента, и то в известном порядке, согласно *адсорбционному ряду.*

На этом базисе основывается новый метод физического анализа, специально применимый к смесям растворимых в вышеупомянутых жидкостях пигментов, — *адсорбционный анализ.*

В смысле термодинамического толкования явлений адсорбции наш метод пользуется свойством различных химических веществ понижать не в одинаковой степени межповерхностное натяжение, существующее на границе жидкости, в которой они растворяются, с другим смачиваемым ею телом, жидким или твердым (адсорбентом). Из смеси растворенных веществ

накопляется на названной границе, т. е. адсорбируется и вытесняет оттуда другие, то, которое наиболее сильно понижает упомянутое натяжение. Отсюда возможность дробного осаждения составных раствора путем методической обработки последнего последующими порциями адсорбента (дробная адсорбция).

При фильтрации же смешанного раствора через столб адсорбента пигменты, путем механизма, изложенного в предыдущей главе, расслаиваются в виде отдельных, различно окрашенных зон. Подобно световым лучам в спектре, различные компоненты сложного пигмента закономерно распределяются друг за другом в столбе адсорбента и становятся доступными качественному и количественному определению. Такой расцвеченный препарат я назвал *хроматограммой*, а соответствующий метод анализа — *хроматографическим методом* (Tswett, 06 III).

Адсорбционный анализ, применимый прежде всего для пигментов, распространяется и на бесцветные, т. е. „невидимо окрашенные", вещества. Присутствие бесцветной промежуточной зоны в хроматограмме доказывает наличность одного или нескольких бесцветных веществ. Однородность такой зоны всегда гадательна, так как границы могущих составлять ее элементарных зон невидимы для глаза. Наглядное разъединение элементов такой смешанной зоны можно было бы произвести, введя в хроматограмму интеркалярные, „вставочные" пигменты, т. е. красящие вещества, по адсорбционному сродству промежуточные между бесцветными компонентами смешанной зоны.

Разъединительная способность адсорбционного анализа

Для того чтобы два находящихся в растворе вещества могли быть разъединены по адсорбционным методам, необ-

ходимо, чтобы они занимали неодинаковый ранг в адсорбционном ряду. В противном случае, в зависимости от относительной концентрации обоих веществ и от фактора адсорбции $\frac{1}{p}$ (см. стр. 92), в хроматограмме должна образоваться зона, смешанная или в некоторой части своей, или на всем своем протяжении. Так как расположение веществ в адсорбционном ряду зависит от природы растворителя (стр. 134), то крайне ничтожной является вероятность, чтобы два вещества были в нескольких растворителях равносильными по адсорбционному сродству. Поэтому смешанная зона, полученная из одного растворителя, обыкновенно будет раздваиваться при пропускании через нее иного растворителя, в случае если окрашенный адсорбент относительно последнего является „пересыщенным". Кроме того, для контроля полноты адсорбционного разъединения исследователь может воспользоваться другим, динамическим фактором дифференцировки веществ, а именно, неодинаковой скоростью миграции адсорбционных зон под влиянием тока чистого растворителя (стр. 125). Так, например, пропускание тока бензола через хроматограмму хлорофилла, полученную из петролейно-эфирного раствора, ведет к быстрому разъединению смешанных первоначально ксантофилловых зон (см. часть II). Последний прием может выручить и в том случае, когда один из присутствующих пигментов, находясь в сравнительно незначительном количестве, удерживается в адсорбционной зоне другого, предшествующего ему в адсорбционном ряду пигмента (возможность такого случая указана на стр. 124).

В предыдущем имелись в виду разбавленные растворы и притом растворы веществ, не действующих друг на друга. При иных условиях хроматографические дифференцировки могут, очевидно, усложняться.

При адсорбции из раствора, очень концентрированного по отношению к одному из компонентов его, не исключена

возможность выделения последнего в свободном виде на поверхности адсорбента.

Представим себе, с другой стороны, что два находящихся в растворе вещества, мономерные частицы которых обозначим через *A* и *B*, способны образовать не только димерные комплексы *AA* и *BB*, но и группы *AB*, так что в растворе имеется равновесие между кинетическими единицами *A*, *B*, *AA*, *BB* и *AB*. Представим себе далее, что *AB* адсорбируется сильнее, чем *A*, *B* и их димеры: в таком случае, при фильтрации через адсорбент, должна образоваться смешанная зона, нерасчленимая под влиянием тока чистого растворителя. Возможен ли в действительности такой случай в настоящее время сказать еще нельзя, но эвентуальность образования смешанной зоны такого происхождения следует иметь в виду. Иные методы физического разделения встречаются, как известно, с подобными затруднениями. Назовем в качестве примеров застывающие без изменения состава „эвтектические" смеси; смеси, дестиллирующие без изменения состава; образование смешанных кристаллов изоморфных и неизоморфных веществ. Для разрешения сомнительных случаев следует прибегать к перекрестным показаниям нескольких методов.

Дробная адсорбция

Смешанный раствор встряхивается с небольшим количеством адсорбента. Адсорбат отделяется посредством отстаивания или лучше центрифугирования и последующей декантации раствора. Или же после непродолжительного отстаивания раствор с осадком выливается на фильтр; фильтрат встряхивается с новой порцией адсорбента.

Неудобство указанного приема заключается в том, что неизвестно заранее, какое количество адсорбента нужно ввести, чтобы поглотить одну из составных раствора, не

трогая следующей по адсорбционному ряду. Поэтому предпочтительно пропускать исследуемый раствор через ряд фильтров, снабженных небольшими количествами адсорбента; но этот прием сводится, собственно говоря, к хроматографическому, являясь лишь его усложнением.

Наиболее пригоден метод дробной адсорбции для отделения неадсорбирующихся веществ от адсорбирующихся, например для отделения каротина от остальных пигментов хлорофилла. Смешанный раствор (в петролейном эфире) встряхивается с избытком адсорбента; жидкость декантируется, адсорбат же (т. е. окрашенный адсорбент) промывается чистым растворителем до тех пор, пока последний не перестанет окрашиваться. Соединенные петролейно эфирные фракции содержат весь каротин исследуемого раствора; других же пигментов, как показывает хроматографическое испытание, не содержат. Дробная адсорбция позволяет, следовательно, производить весьма быстро количественное определение каротина в хлорофилловых растворах.

Хроматографический метод

Хроматографические приборы. Для хроматографического анализа необходимы приборы различного типа в зависимости от того, желательно ли только обнаружить состав имеющейся в растворе смеси пигментов или же требуется отделить последние для ближайшего исследования либо для количественного определения.

Для первой цели пригоден прибор, изображенный на табл. 1, рис. 1, с помощью которого можно в течение нескольких минут произвести качественный анализ сложной смеси. Соединенная с манометром *M* склянка *R* (вместимостью в 3 л) служит резервуаром давления, в который через стеклянную трубку *D*, посредством резиновой груши *P*, можно накачать воздух.

Нагнетательная груша *P* может герметически разобщаться от остальных частей прибора посредством зажима *Q*. Трубка *D*, укрепленная концами на деревянном штативе, играет роль дистрибутора давления; она снабжена некоторым количеством боковых узких ветвей, на которых укрепляются фильтрационные воронки. Рис. 2 табл. 1 изображает такую воронку. Последняя состоит из цилиндрического либо выпуклого резервуара *r*, нижняя часть которого вытягивается в виде цилиндрической трубки *f* (длина 30—40 мм, диам. 2—3 мм). Кончик последней несколько сплавляется, с целью сужения выходного отверстия и образования опоры для адсорбента, который помещается в трубке. В качестве фильтрационных воронок удобно употреблять шлемики известных в бактериологии стеклянок Фрейденрейха. Фильтрационная воронка прикрепляется к дистрибутору давления *D* посредством членика, изображенного на рис. 3 и состоящего из пробки, плотно входящей в отверстие воронки, стеклянной трубки, проходящей через пробку, и резиновой смычки, могущей замыкаться зажимом. Такой способ соединения фильтрационных воронок с аппаратом обеспечивает необходимую подвижность. Под фильтрационными воронками помещаются скляночки, служащие приемниками для фильтратов.

Описанный прибор, благодаря незначительному диаметру столба адсорбента, весьма пригоден для быстрого анализа небольшого количества пигмента.

Для количественного же определения пигментов, или для получения последних в значительном количестве, приходится иметь дело с адсорбционными столбами больших размеров, причем фильтрацию удобнее тогда производить под отрицательным давлением, пользуясь воздушным водоструйным насосом. Увеличение массы адсорбента должно происходить преимущественно за счет диаметра адсорбционного столба, так как увеличение высоты сопряжено

с нежелательным замедлением фильтрационного тока. Но зато, чем больше площадь поперечного сечения адсорбционного цилиндра, тем труднее достичь равномерности тока на протяжении всего сечения, и адсорбатные зоны, вместо того чтобы разграничиваться плоскостями, отделяются друг от друга изогнутыми поверхностями, что подчас очень затрудняет механическое их разделение. Поэтому применяемые мною адсорбционные трубки не превышают в диаметре 30 мм. Рис. 1 табл. II изображает прибор для хроматографии больших количеств пигментных растворов.

Исследуемый пигментный раствор наливается в резервуар *R*, откуда он поступает в цилиндр *A* с адсорбирующим порошком и вытекает в толстостенную склянку *V*, соединяемую посредством боковой трубки с воздушным насосом.

Выбор адсорбента. Применяемый для хроматографического анализа адсорбент должен быть вполне нейтральным веществом по отношению к исследуемым пигментам, т. е. в пределах длительности анализа их не изменять. Он должен быть достаточно мелкозернист, чтобы при небольшом объеме поглощать значительное количество пигментов и чтобы можно было обеспечить полноту поглощения, плотнó утрамбовав порошок и таким образом сузив в достаточной мере пространства между зернышками, образующими капиллярную систему, по которой фильтруется анализируемый раствор. Упомянутым требованиям вполне удовлетворяет, по крайней мере, относительно пигментов хлорофилла, осажденный углекислый кальций (calcium carbonicum praecipitatum).[1] Слабая щелочная реакция, устанавливающаяся в капиллярном слое влаги на поверхности кру-

---

[1] Крупинки этого препарата угловатые либо округленные, средним диаметром в 0.005 см. Предполагая все частички сферическими, указанного диаметра и принимая удельный вес $CaCO_3$ равным 2.8, вычисляется для 1 грамма порошка общая площадь поверхности 428 см^2.

пинок названного адсорбента (ср. Emich), не оказывает влияния на адсорбированные хлорофиллины даже в течение 4 дней, о чем свидетельствует сохранение хлорофиллинами растворимости в углеводородах и спектральных свойств. С целью контроля можно применять в качестве адсорбентов инулин, или обыкновенный сахар, тщательно растертый в ступке. Хроматограммы на сахаре, впрочем, не так отчетливы, как углекальциевые.

Выбор растворителя. В силу соображений, приведенных раньше (стр. 70), петролейный эфир—эта смесь пентана, гексана и нескольких высших гомологов, представляется наиболее рациональным растворителем (средой адсорбции). К сожалению, не все ныне известные красящие вещества спирторастворимой группы фотосинтезных пигментов растворяются в петролейном эфире. Так, например, хлорофиллин γ из бурых водорослей совершенно не растворяется в данной жидкости, и даже хлорофиллины α и β растворяются в ней, как будет показано впоследствии, только благодаря присутствию особого постороннего вещества.

Сероуглерод и бензол имеют то преимущество, что они непосредственно извлекают из растираемых в них свежих листьев совокупность пигментов, почему полученные растворы, после фильтрации через бумагу, прямо годятся для хроматографии; между тем как петролейно-эфирные экстракты, получаемые только под условием прибавления к растворителю спирта, должны быть сперва тщательно отмыты от последнего водою. Производить эту промывку, просто встряхивая экстракт с водою, нецелесообразно, так как при этом возникает, главным образом в водяном слое, очень устойчивая эмульсия, обусловленная выпадающим из петролейно-эфирного раствора коллоидальным веществом и удерживающая некоторое количество пигмента. Для быстрого удаления спирта экстракт помещается в колбе Эрленмейера над двойным объемом дестиллированной воды; осторожным

вращением колбы обе жидкости приводятся в движение, обеспечивая быструю диффузию спирта из экстракта в воду. Затем через две минуты вода удаляется посредством пипетки или сифона и заменяется свежей; по двукратном повторении этого приема концентрация остающегося в экстракте спирта настолько ничтожна, что последний уже не препятствует адсорбции и правильности расслоения пигментов.

Наиболее удобно, однако, производить отмывание спирта при помощи изображенного на табл. 1 рис. 4 прибора. Последний состоит из широкого, конической формы, сосуда (например склянки Гайона), замыкающегося посредством пробки, через которую проходят две трубки *a* и *b*. Одна из них, прямая (*a*), доходит почти до дна сосуда, другая, изогнутая под прямым углом (*b*), выступает лишь на несколько миллиметров из-под пробки. К наружным концам обеих трубок прикреплены короткие отрезки резиновой трубки. В сосуд наливается подлежащий промыванию петролейно-эфирный экстракт, вставляется пробка и через трубку *a* вводится дестиллированная вода. При значительной площади соприкосновения обеих жидкостей переход спирта из петролейного эфира совершается быстро и ускоряется еще вращательным движением, в которое время от времени рукой приводится содержимое склянки. Образование в водяном слое, при движении, особого рода струек („Schlieren") делает переход этот заметным глазу. По истечении двух-трех минут промывная вода переменяется; для этого резиновая смычка на конце трубки *b* замыкается зажимом или просто сжимается пальцами, и весь сосуд опрокидывается вверх дном, после чего воде дают вытекать через трубку *b*. Благодаря форме сосуда, промывную воду можно удалить почти совершенно, оставляя лишь тонкий слой, предохраняющий раствор от соприкосновения с пробкой.

Когда вся вода стекла, трубка *b* вновь замыкается, сосуд ставится в прежнее положение, и в него вновь вводится

вода. Полного очищения экстракта от спирта этилового достигаем в два приема, промывая каждый раз приблизительно двойным объемом воды. Метиловый спирт отмывается еще быстрее.

При отмывании из него спирта петролейно-эфирный экстракт хлорофилла всегда несколько мутнеет, очевидно, вследствие выпадения из него некоторых веществ, удерживающихся в растворе благодаря присутствию спирта. Для удаления мути промытый экстракт фильтруется через двойной бумажный фильтр.

Уже было упомянуто, что хроматограммы хлорофилла, получаемые из петролейно-эфирных растворов последнего, несовершенны в смысле неполноты обособления отдельных веществ. Зоны верхние содержат примеси веществ, принадлежащих зонам, лежащим ниже. Пропускание через хроматограмм тока чистого растворителя не ведет к более полному разъединению вещества вследствие практически полной адсорбции, или, иначе говоря, недиссоциируемости адсорбционных соединений в данном растворителе. Иначе обстоит дело с хроматограммами из сероуглеродного или бензольного растворов. Адсорбционные зоны, уже при отложении их во время фильтрации, получаются более чистыми: ксантофиллы не налегают на хлорофиллин α, хлорофиллины не удерживаются в верхнем бесцветном слое. Кроме того при пропускании через хроматограммы тока сероуглерода или бензола происходит заметной скорости миграция зон, ведущая к большему их обособлению. Последним свойством сероуглерода и бензола можно воспользоваться для „проявления“ хроматограмм, полученных из петролейно-эфирных растворов.

Особенно отчетливые хроматограммы на $CaCO_3$ получаются из сероуглеродных растворов (ср. стр. 131) или при пропускании сероуглерода через хроматограммы петролейно-эфирного происхождения. Из бензольного раствора ксанто-

филлы α и α' получаются в виде очень бледных, расплывчатых зон; хлорофилланы же совсем не адсорбируются, точно так же как и каротин. Последний не адсорбируется тоже и из сероуглеродного раствора.

Как видно из предыдущего, различные растворители имеют, в качестве среды адсорбции, каждый свои преимущества и недостатки и каждый свою сферу применения.

Техника хроматографического анализа. Узкие адсорбционные воронки наполняются адсорбентом следующим образом. Сперва суженный кончик трубки снабжается маленькой ватной пробкой, которая вводится со стороны резервуара и вталкивается посредством стеклянной палочки, плотно входящей в трубку. В резервуар всыпается затем адсорбент, вводится с помощью упомянутой палочки в трубку и тщательно утрамбовывается в ней, чтобы придать адсорбционному столбу плотную, однородную текстуру. Последнее весьма существенно в виду обеспечения через столб равномерной фильтрации. В противном случае адсорбционные зоны разграничиваются извилистыми плоскостями и обладают неравномерной толщиной.

Для заряжения больших адсорбционных цилиндров в суженное горлышко их вставляется сперва ватная пробка, сверх которой всыпается трехсантиметровый слой песку и утрамбовывается деревянным шомполом. Затем всыпается адсорбент и также тщательно утрамбовывается. Высота столба уплотненного адсорбента ($CaCO_3$) не более 80 мм, дабы не слишком замедлить скорость фильтрации через него растворов. Прослойка песку имеет целью образование плотного, не поддающегося во время утрамбовки, субстрата для адсорбента.

Фильтрация исследуемых растворов производится в маленьком аппарате при манометрическом давлении в 250—300 мм ртути. Перед тем как вливать в вороночку раствор, небесполезно вдавить в адсорбционную трубку маленький тампон

ваты и влить несколько капель растворителя с целью пропитать верхние слои адсорбента, после чего вату можно снять. Иначе может зачастую случиться, что при вливании в воронку испытуемого раствора поверхностный слой адсорбента, вероятно вследствие выделяющейся при смачивании теплоты Pouillet, вдруг приподнимается и опрокидывается образовавшимся под ним пузырем воздуха, и обломки его, ложась на поверхность столба адсорбента, мешают правильному ходу хроматографического расслоения.

При работе с большими адсорбционными цилиндрами последние соединяются сначала с вакуум-аппаратом, и только после приведения его в действие вливается исследуемый раствор.

Пропустив через столб адсорбента желаемое количество раствора, полученную хроматограмму подвергают окончательному „проявлению“ посредством пропускания через него тока чистого растворителя. В качестве проявителей для хроматограмм хлорофилла особенно пригодны, как мы видели, сероуглерод и бензол. Так как в последнем миграция ксантофилловых (α и α') слоев очень быстра, то при достаточно продолжительном пропускании бензола можно легко вымыть из адсорбционного столба эти ксантофиллы и получить их отдельно в виде бензольных растворов.

Когда при „проявлении“ адсорбционные зоны достаточно разъединились, дальнейший приток растворителя прекращается; если последним был сероуглерод или бензол, то, для вытеснения его с поверхности адсорбента, пропускается петролейный эфир, а затем прогоняется воздух (или светильный газ), который вытесняет из капиллярных пространств столба адсорбента наполняющую их жидкость.

Адсорбционный столб в силу этого приобретает некоторую связность, почему его возможно вытолкнуть из прибора в виде белоснежного расцвеченного разноцветными полосами цилиндра. Последний кладется на глянцевитую

бумагу, и отдельные зоны немедленно посредством скальпеля отрезываются, после чего пигменты извлекаются из них спиртом, эфиром или петролейным эфиром с примесью спирта. В случае если две окрашенные зоны соприкасаются непосредственно и разграничивающая их плоскость является извилистой, отделение обеих зон начисто — затруднительно; приходится тогда пожертвовать пограничными слоями их обеих.

Глава VI

МЕТОД ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО РАСТВОРЕНИЯ

Теория

Возьмем две жидкости *A* и *B*, не смешивающиеся между собой или смешивающиеся в ограниченных пропорциях и потому образующие при совмещении их в одном сосуде двуфазную систему. Каждая фаза представляет собой смесь обеих жидкостей, причем в одной количественно преобладает *A*, а в другой *B*. Благодаря этому, растворительные свойства обеих фаз неодинаковы, а при введении в систему какого-нибудь растворимого в *A* или *B*, или в *A* и *B* вещества, оно распределится между обеими фазами неодинаково. Каждому веществу присущ особый коэффициент распределения, так что при введении в систему смеси нескольких растворимых веществ относительное количество каждого компонента данной смеси не будет вообще в обеих фазах одинаково. Отсюда возможность обнаружить смешанный характер какого-нибудь вещества, подвергая его распределению в двуфазной системе. Химические или спектроскопические свойства растворенного в обеих фазах будут, в случае смеси, неодинаковы. Более того, метод дает возможность изолировать компоненты смеси.

Возьмем смесь, состоящую из m весовых частей вещества a; m' частей вещества b и m'' частей вещества c. Коэф-

фициенты распределения данных веществ относительно определенной двуфазной системы: $\frac{x}{y}$, $\frac{x'}{y'}$ и $\frac{x''}{y''}$.

Внося смесь в систему, получим по установлении равновесия следующее распределение[1] (объемы обеих фаз предполагаются равными):

Вещества	Количество растворенного вещества	
	Фаза A	Фаза B
a	$m\left(\frac{x}{x+y}\right)$	$m\left(\frac{y}{x+y}\right)$
b	$m'\left(\frac{x'}{x'+y'}\right)$	$m'\left(\frac{y'}{x'+y'}\right)$
c	$m''\left(\frac{x''}{x''+y''}\right)$	$m''\left(\frac{y''}{x''+y''}\right)$

Если, отделив фазу A, будем ее повторно взбалтывать с новыми, равными по объему фракциями жидкости, господствующей в фазе B, то после n таких операций количество остающихся в A веществ будет очевидно

$$m\left(\frac{x}{x+y}\right)^n, \qquad m'\left(\frac{x'}{x'+y'}\right)^n, \qquad m''\left(\frac{x''}{x''+y''}\right)^n.$$

Из этого следует, что, даже при небольшой разнице в коэффициентах распределения составных смеси, возможно путем многократного „вытряхивания" раствора другим растворителем настолько изменить относительные пропорции растворенных веществ, что концентрация одного из них

[1] Предполагается, разумеется, что присутствующие вещества не влияют на растворимость друг друга и что концентрация их настолько незначительна, что растворенное не влияет на состав фаз растворителя.

становится ничтожна в сравнении с концентрацией других. И так для каждой составной поочередно.

Возьмем числовой пример. Имеем смесь равных долей веществ *a*, *b* и *c*, коэффициенты распределения которых

Вещества	Количество вещества, растворенного в жидкости *A*		
	первоначально	после трех встряхиваний с *B*	после 125 встряхиваний с *B*
a	I	0.85737	0.001642
b	I	0.72900	0.000001906
c	I	0.00100	10^{-125}

$\left(\frac{\text{концентрация в } A}{\text{концентрация в } B}\right)$ для определенной двуфазной системы равны 95/5, 90/10 и 10/90. Смесь растворяем в жидкости *A* и встряхиваем последовательно с равными объемами жидкости *B*.

Следовательно, уже после трех встряхиваний отношение концентрации *c* к концентрации *a* становится в 857 раз меньше первоначального; смесь может считаться очищенной от *c*. Соответственная степень очищения *a* от *b* может быть достигнута лишь после 125 встряхиваний, причем концентрация *a* падет до 608-й части первоначальной величины. Соединяя промывные фракции жидкости *B* и методически встряхивая с жидкостью *A*, можно было бы таким же образом изолировать вещество *b* от вещества *a*.

Разъединительная способность рассматриваемого метода теоретически неограничена. На практике же метод применим для разделения веществ или групп веществ, обладающих очень различными, так сказать, противоположными коэффициентами распределения, для отделения веществ эпифазных, т. е. сосредоточивающихся преимущественно в верхней фазе

системы, от веществ противоположного свойства (гипофазных). Отделение веществ, обладающих близкими коэффициентами распределения, требовало бы, как видно из приведенного примера, громадного количества исходного раствора и жидкостей, не говоря уже о времени.

Критика частных методов

Метод дифференциального растворения был введен в растительную хроматологию Stokes'ом (64) и Sorby (73). Оба ученые применяли двуфазные системы, состоящие из сероуглерода, этилового спирта и воды. Особенно искусно использован метод Sorby, которому удалось обнаружить главнейшие компоненты хлорофилла.

Более известен так называемый метод Крауса (Kraus et Milliardet, 68, Kraus, 72), в котором применяется двуфазная система, состоящая из этилового спирта, воды и бензина или петролейного эфира (Chautard, 74; Guignet, 85, Monteverde, 93).

Метод Крауса был бы идеален в случаях смесей двух веществ, обладающих заметно различными коэффициентами распределения в данной системе. Однако хлорофилл, равно как и спирторастворимые (липоидные) группы пигментов иных хромофиллов являются весьма сложными смесями, и метод Крауса, в пределах практической применяемости, может в лучшем случае разделить эти смеси на группы гипофазных и эпифазных пигментов.

Остановимся на хлорофилле, представляющем согласно моим исследованиям смесь хлорофиллина α, хлорофиллина β каротина и ксантофиллов α, α', β.

Типичная реакция Крауса с хлорофиллом наблюдается при пропорции воды к алкоголю, соответствующей 80-процентному спирту, причем бензина или петролейного эфира берется в два раза больше, чем спирта. В такой системе первые три поименованные пигмента хлорофилла в сильной

степени эпифазны, остальные же гипофазны; одни и другие не в одинаковой степени. „Кианофилл“ Крауса, т. е. верхняя сине-зеленая бензинная фаза, должен, следовательно, содержать преимущественно оба хлорофиллина и каротин.

Адсорбционный анализ краусовского кианофилла подтверждает этот вывод. Раствор кианофилла в петролейном эфире промывается водой с целью удаления из него спирта (см. выше стр. 147) и встряхивается с порошком $CaCO_3$. Адсорбент оседает, окрашенный в зеленый цвет, между тем как жидкость всплывает желтой и представляет спектр каротина. При фильтровании же раствора ксантофилла через столб $CaCO_3$ появляются, кроме адсорбционной зоны хлорофиллина α, узкие зоны хлорофиллина β и ксантофилла. Из трубки вытекает раствор каротина.

Присутствие желтого пигмента в кианофилле Крауса было уже доказано Guignet и особенно Monteverde (93), который отожествил этот пигмент с каротином. Монтеверде пользовался следующим способом отделения: кианофилловый раствор смешивается с абсолютным алкоголем, и к однородной жидкости прибавляется по каплям вода. Наступает момент образования двух фаз, и выделяющийся петролейный эфир увлекает с собой преимущественно каротин, между тем как хлорофиллины остаются почти целиком в спиртовой фазе. Взбалтывая последнюю с небольшим количеством петролейного эфира, мы достигаем дальнейшего очищения ее от каротина. Этот прием сводится к тому, что создается двуфазная система, где пропорция воды меньше, чем в нормальной краусовской, т. е. применяется спирт большей концентрации (около 95%). В таком случае хлорофиллины являются гипофазными, а каротин остается эпифазным, хотя и в меньшей степени. Повторяя опыты Монтеверде с вытяжкой из Aspidistra elatior, я не достиг вышеупомянутым способом (после двух взбалтываний) полного удаления каротина из кианофилла. Хрома-

тографический анализ очищенного кианофилла показал присутствие следов каротина. Кроме того, имелись налицо следы хлорофиллина β и ксантофилла. В спектре поглощения очищенного по Монтеверде кианофилла[1] характерные полосы поглощения хлорофиллина β (I и VI), впрочем, не обнаруживались;[2] пропорция последнего пигмента, очевидно, слишком незначительна, чтобы его спектральные поглощения могли проявиться при слабой концентрации (толщине слоя) смешанного раствора, а при больших концентрациях расширенные полосы поглощения хлорофилла α налегают на полосы хлорофиллина β или сливаются с ними.

В целях выделения из хлорофилла каротина по методу дифференциального растворения (а также для удаления каротина из „кианофилла") удобно пользоваться, как найдено мною, метиловым спиртом, который, от прибавления к нему уже самого незначительного количества воды, теряет способность смешиваться во всех пропорциях с петролейным эфиром.

Приготовляем петролейно-эфирный раствор хлорофилла; взбалтывая 15 см^3 его с 5 см^3 метанола (препарат Schering'a, содержащий следы воды), получаем две фазы. Нижняя (7 см^3) зеленого, верхняя (13 см^3) зеленовато-желтого цвета. Взбалтывая верхнюю фазу несколько раз с новыми небольшими порциями метанола, мы получаем ее, наконец, чисто желтой и обнаруживаем в ней полосы поглощения каротина. Много каротина, однако, остается в метаноловых фракциях.

Если взбалтывать петролейно-эфирный раствор каротина с метанолом, то значительная часть пигмента переходит

[1] Монтеверде называет его „аморфным хлорофиллом".

[2] То же самое наблюдал Монтеверде. В оригинальном же кианофилле Крауса, согласно его наблюдениям, выступают между линиями *F* и *g* две полосы поглощения, первая из которых, более слабая, принадлежит хлорофиллину β. Полосы поглощения каротина не выступают вследствие слабой относительной пропорции этого пигмента.

в метаноловую фазу, так что концентрация каротина в последней равняется (по колориметрическому сравнению) приблизительно четвертой части равновесной концентрации в петролейно-эфирной фазе. Водному 85%-ному раствору метанола петролейно-эфирный раствор каротина пигмента практически совсем не отдает.

Итак, бензинная (петролейно-эфирная) фаза Краусовской реакции (кианофилл) содержит, кроме каротина, хлорофиллины α и β и немного ксантофиллов. Последние, так как они сильно гипофазны, легко удалить путем последовательного промывания петролейно-эфирного раствора 80-процентным спиртом. Хлорофиллины же эпифазны, хотя и не в одинаковой степени: первый более, чем второй. Этой разницей можно воспользоваться для относительного очищения пигмента α и β (см. выше стр. 154). Действительно, путем повторяемых взбалтываний раствора с 80-процентным спиртом[1] достигается изменение относительных пропорций обоих пигментов, и характерные полосы хлорофиллина β (I и VI) постепенно бледнеют и, наконец, становятся неуловимыми. Разумеется, при этом теряется большое количество хлорофиллина α, и относительная концентрация каротина постоянно возрастает, благодаря его совершенной эпифазности.

Вследствие того что хлорофиллин β менее эпифазен, чем хлорофиллин α, спиртовые фракции, служащие для промывания кианофилла, увлекают сравнительно больше пигмента β, чем пигмента α. Собирая эти фракции и методически обрабатывая их петролейным эфиром, можно было бы, следовательно, получить в конце концов раствор, в котором пигмент β преобладал бы в любой степени над пигментом α.

[1] Этот спирт нужно предварительно насытить петролейным эфиром, если нежелательно уменьшение объема промываемого раствора. Или же можно к последнему прибавлять немного петролейного эфира постепенно.

Если этот результат практически и недостижим, то все же, получая растворы, сравнительно обогащенные хлорофиллином β, мы заставляем выступать его специфические спектральные поглощения, что имеет как эвристическое, так и контрольное значение. Во второй части настоящей книги мы увидим, что рационально использованный метод Крауса позволяет контролировать спектроскопические наблюдения, произведенные над хлорофиллами, отделенными по адсорбционному методу.

Обратимся теперь к *ксантофиллу* Крауса. По способу получения он должен содержать в себе все гипофазные (в данной системе растворителей) пигменты хлорофилла. Адсорбционный анализ обнаруживает таковых не менее трех: ксантофилл α, α' и β. Наиболее гипофазен ксантофилл β, наименее — ксантофилл α.

На этом основании легко обнаружить спектроскопическим путем неоднородность „ксантофилла" Крауса. Прибавляя к спиртовому раствору названного „ксантофилла" постепенно воды и встряхивая каждый раз с петролейным эфиром, получаем петролейно-эфирные фракции, спектральные свойства которых не одинаковы, а именно: оси обеих полос поглощения между линиями *F* и *G* перемещаются в последующих фракциях постепенно слева направо.

Метод Стокляса. Из описания „реакции Крауса", данного самим автором, явствует, что он применял петролейный *бензин.* Wiesner (74) и некоторые другие показали, что можно пользоваться и бензолом, а также толуолом и ксилолом. Konrad (72), работая с бензолом, отметил, что для удачного разделения хлорофилла на ксантофилл и кианофилл, спиртовой раствор пигмента должен быть разбавлен водою до крепости ниже 65%. Действительно, при употреблении более концентрированного спирта последний образует с бензолом трудно разрешающуюся эмульсию или же единственную жидкую фазу. Тот же бензол, применм-

тельно к реакции Крауса, употреблялся в новейшее время Stoklasa (96, 08) с целью получать мифический „чистый хлорофилл“ для химического анализа. Пражский ученый думает именно, что „кианофилл“ Крауса есть определенный пигмент: легендарный зеленый „хлорофилл“.

Очевидно, прежде всего, что бензольная фаза в системе, употребляемой Стокляса, должна содержать весь каротин; что же касается распределения остальных пигментов, то мною предпринят был следующий опыт.

Растертые с наждаком листья шпината были быстро извлечены на холоду алкоголем. Профильтрованный темнозеленый раствор был смешан с бензолом, прибавлялось затем к нему воды до тех пор, пока, после встряхивания, мутная эмульсия не разрешалась с заметной быстротой на нижнюю — желтую и верхнюю — темнозеленую фазы. Первая затем удалялась, а вторая, разбавленная бензолом, еще два раза промывалась водным спиртом. Затем бензольная фаза была сильно разбавлена петролейным эфиром, и смесь промыта водою с целью удаления спирта (стр. 147). Хроматографическое разложение раствора в столбе CaCO дало следующие зоны:

A. Бесцветная.

B. Желто-зеленая (хлорофиллин β).

C. Зеленовато-синяя (хлорофиллин α).

D. Желтая (ксантофиллы).

Кроме того, внизу была замечена слабоокрашенная зона серого стального цвета (хлорофиллин α), а из трубки вытекала желтая жидкость (раствор каротина); зона *A* была приблизительно так же высока, как *B*, и в два, три раза ниже *C*. По пропускании тока чистого бензола все зоны расширились, и желтая раздвоилась. Как видно, реакция Крауса, произведенная с бензолом, не в состоянии выделить в бензольной фазе какой бы то ни было пигмент хлорофилла. Последняя содержит не только оба хлорофил-

лина, ксантофиллы и каротин, но еще бесцветные примеси (зона *A* вышеупомянутого хроматограмма). Следует упомянуть, что в дважды промытом спиртом „кианофилле“ Крауса эти примеси отсутствуют.

Метод Стокса и Сорби. Экспериментального исследования метода Stokes'а и Sorby (73) я не предпринимал. Из подробного исследования последнего автора видно, что сероуглерод играет в его методе ту же роль, что бензин в методе Крауса: хлорофиллины α и β („синий и желтый хлофиллины“ Sorby) скопляются преимущественно в сероуглеродной фазе (которая является нижней), равно как каротин („оранжевый ксантофилл“ Sorby), между тем как ксантофиллы остаются в спиртовой фазе. Для отделения каротина от хлорофиллинов Sorby встряхивает сероуглеродную фазу многократно со свежими порциями спирта, который уносит мало-помалу хлорофиллины, оставляя в сероуглероде каротин. Получить в чистом виде хлорофиллин β Sorby не удалось; он получал лишь обогащенные этим пигментом смеси с хлорофиллином α. Что касается желтой спиртовой фазы, получаемой при встряхивании раствора хлорофилла с сероуглеродом, то Sorby мог убедиться на основании приема, аналогичного описанному мною выше (стр. 159), что она не содержит однородного пигмента. Он предположил существование в ней двух ксантофиллов („ксантофилл“ и „желтый ксантофилл“).

Глава VII

КАПИЛЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ

Еще в шестидесятых годах замечено Schönbein'ом, что при капиллярном восхождении водяных растворов (кислот, щелочей, солей, красящих веществ) в полоске неклееной бумаги растворитель поднимается быстрее, чем растворен-

ное вещество; также, что если в растворе имеется несколько веществ, то они поднимаются с неодинаковой быстротой, вследствие чего, в случае смеси красок, получаются на бумаге различно окрашенные зоны.

Причину этих явлений Schönbein усмотрел в „капиллярном притяжении" бумаги и указал на их применение к анализу смесей, преимущественно органических пигментов.

Практической разработке идеи Schönbein'а посвятил себя с 1861 г. Goppelsroeder, с достойным удивления терпением накопивший громадное количество наблюдений над результатами "капилляризации" всевозможных растворов, экстрактов, физиологических жидкостей. Наблюдения эти трижды собраны базельским ученым в объемистых, тяжелых эрудиционными дисгрессиями, сочинениях. Метод отделения смешанных в растворе веществ, основанный на неодинаковой скорости восхождения их в полосе фильтровальной бумаги (или иной ткани) Goppelsroeder назвал капиллярным анализом.[1]

Механизм капиллярных расслоений остался доселе невыясненным.

В то время как Ostwald (03) предполагает в них проявление адсорбции,[2] Fischer u. Schmidmer доказывают, что расслоения эти получаются по крайней мере в случае минеральных веществ, адсорбция которых бумагой ничтожна, благодаря неодинаковой скорости диффузии различных веществ. Goppelsroeder, который сам не выходит из границ эмпирической разработки подмеченного Schönbein'ом явле-

---

[1] Применение метода к анализу смесей минеральных солей сделано Bayley (78) и Frey (98). Последний описывает удобный прибор для капилляризации растворов концентрическими зонами.

[2] Pelet et Jess (08) нашли, что базические краски поднимаются в фильтровальной бумаге выше кислотных (при одинаковой концентрации раствора). Последние адсорбируются бумагой меньше первых.

ния, принимает толкование Ostwald'а[1] и на этом основании называет капиллярный анализ также адсорбционным (06, стр. 239). Хотя в условиях опытов капилляризации и должны зачастую проявляться явления адсорбции, тем не менее, чтобы не путать методов, совершенно, как мы увидим, различных, как по существу, так и по результатам, будет уместно сохранить наименование капиллярного анализа за приемами „капилляризации" растворов; под адсорбционным же анализом понимать исключительно методы, выработанные мною, изложенные в главе V.[2]

Рассматривая ближе наличные условия группировки веществ в опытах капилляризации, мы должны убедиться, что тут действуют разнообразные факторы.

При капилляризации водных растворов мы имеем, во-первых, дело с различной скоростью диффузии (различными коэффициентами диффузии) разнообразных составных раствора, благодаря которой вещество (не адсорбируемое), обладающее наибольшим коэффициентом, будет опережать остальные, образуя в верхней части смачиваемого участка бумаги чистую зону, между тем как следующая снизу зона будет содержать то же самое вещество, что первая, плюс

---

[1] Как понимает Goppelsroeder роль адсорбции в капилляризационных опытах, видно из следующего абзаца (06, стр. 4). Durch die Capillarkraft wird die Flussigkeit im Capillarstreif nebst den in ihr gelöst enthaltenen Körpern emporgehoben, bis dass die Adsorptionskraft einen Halt und zwar je nach der Natur der einzelnen Körpern einen früheren oder späteren Halt auf der Capillarbahn gebietet.

[Благодаря капиллярной силе раствор с содержащимися в нем веществами идет по столбу капиллярного поднятия до тех пор, пока адсорбционные силы не остановят поднятия в зависимости от природы того или другого вещества. — Ред.]

[2] Неуместно также название адсорбционного анализа для элективного поглощения различных энзим основными и кислотными адсорбеитами (Michaelis u. Ehrenreich). Это явление не адсорбции, даже не электрохимической адсорбции, а просто химического соединения.

вещество, обладающее ближайшим коэффициентом диффузии. Третья зона будет содержать по той же причине три вещества и т. д.

Достигаемое таким образом парциальное отделение веществ может быть только временным, так как после достижения растворителем в полосе фильтровальной бумаги наивысшего уровня дальнейшее действие диффузионных сил стремится, очевидно, к равномерному распределению различных веществ на всем протяжении смачиваемого растворителем пространства.

Значение второго фактора, адсорбционного, становится для нас ясным лишь в освещении результатов, изложенных выше, в главе IV. Нет повода сомневаться, что мой закон адсорбционного замещения приложим и для растворимых в воде веществ (поскольку они не реагируют друг на друга) и что, вследствие этого, полоса фильтровальной бумаги, применяемая для капилляризации растворов, является аналогом столба углекисло-кальциевого порошка или иного адсорбента, применяемого в хроматографическом анализе. В обоих случаях полное расслоение компонентов смеси может быть достигнуто, очевидно, только динамическим путем, т. е. на основании неравномерной миграции адсорбционных зон под влиянием тока чистого растворителя аметно диссоциирующего наличные адсорбционные соединения (стр. 125).

Третий фактор, с которым нужно считаться в опытах капилляризации водных растворов, это явления диффузии и адсорбции коллоидально растворенных веществ (гидрозолей), частички которых (ультрамикроны), обладая электрическими зарядами (ср., например, Billitzer), должны испытывать притяжение со стороны волокон, составляющих среду капилляризации, в случае если последние обладают противоположным зарядом. Вопрос этот требует еще теоретической разработки.

В опытах капилляризации спиртовых растворов выступает еще новый фактор, играющий едва ли не главную роль в получаемых расслоениях. Спиртовые растворы (например, хлорофилловые экстракты) обыкновенно содержат воду. При капиллярном восхождении такого раствора в полосе бумаги, в случае если опыт не производится в замкнутом, насыщенном парами растворителя пространстве, будет испаряться преимущественно алкоголь; более того, если окружающая атмосфера содержит пары воды, последние будут осаждаться на смоченной спиртом бумаге, чему должно содействовать охлаждение последней, охлаждение, являющееся результатом испарения алкоголя. Следовательно, по мере восхождения раствора в бумаге, он будет постепенно обедняться спиртом и обогащаться (относительно и абсолютно) водою, и вещества, нерастворимые в воде, будут постепенно выпадать из раствора, осаждаясь между волокнами, внутри полостей последних или в междумицелярных пространствах стенок. Изменение концентрации растворителя (спирта) может еще до осаждения растворенных веществ создать условия для адсорбции, если растворенное вещество понижает межповерхностное натяжение между волокном и водным спиртом более, чем таковое между волокном и алкоголем.

Разобравши таким образом теоретические условия капиллярного анализа, обратимся к его хроматографическим применениям. Goppelsroeder исследовал большое количество спиртовых экстрактов листьев, стеблей, цветков и пр. Экстракты производились абсолютным спиртом, но, повидимому, из свежих органов. Капилляризация велась в длинных полосах фильтровальной бумаги, подвешенных вертикально так, чтобы нижний край бумаги опускался на 4 см в исследуемый раствор. Опыт длился до 24 часов. При капилляризации экстрактов из листьев Goppelsroeder получал (06, стр. 86) полосы, окрашенные в зеленый, в желтый, бурый, розовый

цвета. Бурую он относит к хлорофиллану, зеленую — к „хлорофиллу". Так как алкоголь способен извлекать из листьев водорастворимые хромогены (см. II часть), то в капилляризационных полосах могут появляться зоны, окрашенные продуктами окисления названных хромогенов, возникающих во время капилляризации. Розовые полоски могут происходить от веществ из группы эритрофилла (антоциана). К сожалению, Goppelsroeder, довольствуясь получением и описанием своих разноцветных полосок, не постарался исследовать их подробно.

Для проверки пригодности капиллярного анализа предприняты были мною следующие опыты. Из сухих листьев Lamium album была приготовлена хлорофилловая вытяжка в абсолютном спирте (99,8%). Капилляризация в замкнутом, сухом пространстве не дала никаких красочных дифференциаций. Во влажном же воздухе получились следующие зоны, считая сверху:

1) влажная бесцветная;
2) желтая;
3) сине-зеленая;
4) зеленовато-желтая;
5) бледнозеленая;

Пятая зона представляла такую же окраску, как бумага, погруженная в раствор немедленно после извлечения ее оттуда; она была пропитана цельным раствором. Третья зона, очевидно, обусловлена смесью хлорофиллинов α и β; окраска второй — ксантофиллинами, четвертой—преимущественно каротином. Доказательством служит тот факт, что если бумажку высушить и обработать петролейным эфиром, то вторая зона остается окрашенной, между тем как четвертая обесцвечивается почти совершенно (остается зеленоватый оттенок). Как известно (стр. 105), каротин не адсорбируется бумагой из петролейного эфира в противоположность ксантофиллам. Что касается первой зоны, то ее зани-

мает сильно разбавленный водою спирт. Действительно, если на расцвеченную бумажку положить полоску синей кобальтовой бумаги и провести по последней шпателем, то на ней остается розовый отпечаток, свидетельствующий о распределении воды в капилляризационной бумажке. Розовая окраска, наиболее интенсивная в участке, соответствующем первой бесцветной зоне, простирается до нижней желтой зоны (каротиновой) включительно.

Механизм полученных при капилляризации хлорофиллового раствора красочных дифференциаций прозрачен. Спирт, поднимаясь в бумаге, обогащается водой, вследствие чего растворенные пигменты выпадают из раствора и осаждаются, согласно порядку убывающей растворимости в слабом спирте, т. е. сперва каротин, затем оба хлорофиллина и, наконец, ксантофиллы.

Подобные же результаты получаются при капилляризации на открытом воздухе хлорофилловых экстрактов в петролейном эфире с примесью $^1/_{10}$ спирта (стр. 71). Наиболее быстро испаряется петролейный эфир, затем спирт, причем вследствие охлаждения конденсируются пары воды, и каротин первый выпадает из раствора, между тем как остальные пигменты, более растворимые в разведенном спирте, переносятся дальше.

Аналогичное расслоение наблюдается при медленном испарении на фарфоровой чаше тонкого слоя хлорофиллового раствора в спирту. Образуется, как впервые заметил N. Müller (69), наружное желтое кольцо, затем сине-зеленое и, наконец, внутреннее зеленое. Необходимым условием является присутствие воды в растворе или в воздушном пространстве, где производится опыт. Такие же концентрические слои появляются при испарении капли хлорофиллового раствора на белой бумаге, причем наружное кольцо по высыхании получается иногда полупрозрачным, как бы пропитанным маслом. Müller объясняет эти явления тем,

что на краю жидкости, где испарение спирта более значительно, конденсируются пары воды, вследствие чего „желтый пигмент“ хлорофилла, несомый жировым веществом, осаждается.

Толкование Müller'а справедливо; нужно только добавить, что осаждающееся на периферии желтое вещество должен быть каротин, между тем как ксантофиллы и эвентуально водорастворимые желтые пигменты, продукты окисления упомянутых выше хромогенов, должны оставаться в центре. Хлорофиллины же должны находиться преимущественно в промежуточной зоне. Такого же рода опыты производил Tschirch (84, 1, стр. 50). Вне наружного желтого кольца он подметил еще буроватое, обусловленное, как показало спектроскопическое исследование, — хлорофилланом. Очевидно, исследуемый раствор был в значительной степени изменен кислотами клеточного сока.

Капиллярный анализ был применен впоследствии Tschirh'ом (04) для исследования желтых пигментов растительного происхождения; об этих исследованиях будет упомянуто во второй части настоящего сочинения.

Из теоретических соображений как и из сопоставления результатов капиллярного анализа хлорофилла (см. выше) с таковыми же адсорбционного анализа (гл. V), явствует превосходство второго. Получаемые в первом частичные отделения — грубы, несовершенны; капилляризационные хроматограммы дают крайне несовершенное представление о действительном разнообразии компонентов сложного пигмента.

Выделение отдельных пигментов из последовательных зон капилляризационных хроматограмм могло бы происходить только наугад и, вообще говоря, только на основании многочисленных „перекапилляризаций“ пигментов, отложенных в отдельных участках.

Кроме того, условия анализа — продолжительная капилляризация растворов на воздухе в присутствии воды и элек-

тролитов, извлекаемых спиртом из тканей, — открывают возможность разнообразных химических изменений пигментов.

Дальнейшая разработка капиллярного анализа является, однако, весьма желательной в применении к анализу веществ, нерастворимых в петролейном эфире, бензоле или сероуглероде и, может быть, не поддающихся хроматографическому адсорбционному исследованию.[1] Таковыми являются прежде всего водорастворимые компоненты хромофиллов синих и красных водорослей.

Припомним здесь старый опыт Cohn'a (67), получившего при испарении капли раствора „фикоциана“ из *Spirulina versicolor* на фильтровальной бумаге 3 кольца: наружное — бесцветное, среднее — синее, а внутреннее — бледнокрасное.

Глава VIII

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ ПИГМЕНТОВ

Отделение друг от друга смешанных веществ и получение их в чистом виде можно совершать не только физическим путем, пользуясь различиями в их физических свойствах (растворимость, адсорбционное сродство и др.), но и химическим, превращая вещества в производные, свойства которых дозволяют удобное разделение. И тут возможны различные случаи.

Некоторые компоненты могут быть подвержены необратимым изменениям, благодаря которым их легко выделить

[1] При работе с водными растворами выбор адсорбента крайне ограничен, так как адсорбент должен быть практически нерастворим в среде адсорбции. При адсорбции из водных растворов должно проявляться зачастую то, что Michaelis и Ehrenreich (08) называют электрохимической адсорбцией и что в сущности не что иное, как химическое соединение.

Фильтрация водных растворов через плотные столбы мелкозернистых адсорбентов ($CaCO_3$, SiO_2) очень медленна. Быть может, удастся здесь применение дробной адсорбции.

из смеси и тем облегчить физическое разделение остальных веществ. Так, например, подвергая омылению смеси жировых веществ с пигментами, неизменяемыми щелочами и растворимыми в эфире, можно легко выделить последние и разделить их затем путем дробной кристаллизации.

Или же совокупность, или часть компонентов смеси подвергаются соединениям или разложениям, продукты которых можно легко отделить друг от друга и получить из них путем новой химической реакции первоначальные вещества.

Само собою разумеется, химические методы разделения смесей неизвестных веществ не имеют самостоятельного значения и могут давать положительные результаты только под условием контроля физическими методами, ибо только знакомство с веществами естественными, безусловно не подвергающимися химическим реагентам, позволяет сказать, изменяется ли данное вещество тем или иным реагентом, и если изменяется, то каким образом. При отсутствии такого контроля возможны только умозрения, а не научные выводы; эта очевидная истина, однако, как будто не всеми сознается.

Приведу пример из истории исследования хлорофилла. Hansen (89), подражая Kühne, работавшему над пигментами сетчатой оболочки, применил метод омыления к исследованию хлорофилла. Получивши при этом две группы веществ: зеленую смесь продуктов щелочного разложения хлорофиллинов и желтую смесь ксантофиллинов (каротин, ксантофиллы), Hansen решил, что имеет дело с двумя естественными составными хлорофилла. Некоторые ученые уверовали в это положение. Не говоря, однако, о том, что однородность обоих препаратов ничем не была доказана, предсуществование их в хлорофилле являлось вполне произвольным допущением. Не было ведь доказательства, что они не были продуктом разложения естественных пигментов под влиянием едкого натра.

Хотя в определении качественного состава смешанных пигментов химические методы разделения лишены аподикти-

ческого значения, им может принадлежать иногда эвристическая роль; выделенный, например, путем химической реакции кристаллический пигмент, если он не является явственно с самого начала дериватом, может быть изучен и затем отыскиваем физическими методами в естественном пигменте.

К химическим методам принадлежит дробная коагуляция белковых пигментов (фикоцианы, фикоэритрины) при нагревании их растворов. Так например, Sorby (77) различает у *Oscillaria* три *фикоциана*, коагулирующие при температурах 65°, 75° и 80° и обладающие характерными полосами поглощения в спектре. Предсуществование в растении отделенных таким образом пигментов, очевидно, гипотетично; но сложность гидрохромов водорослей подтверждается иными фактами (см. II часть). Подобное же дробное разрушение пигментов Sorby (70) получал при гниении раствора фикоциана или под влиянием прибавления спирта к раствору.

Химические методы разделения пигментов могут иметь значение для удобного приготовления некоторых из них в большом, достаточном для химического анализа количестве. Убедившись, например, что щелочи не производят изменения пигментов ксантофилловой группы, можно пользоваться приемами омыления хлорофилловой вытяжки для удаления из нее жировых веществ, лецитинов, хлорофиллинов, после чего уже желтые пигменты легко поддаются массовому разделению и кристаллизации. Таким приемом пользовались в новейшее время Wilstatter и Mieg (07) для приготовления „ксантофилла“ (повидимому ксантофилла α).

Микрохимические методы

Химические методы, равно как и физические, могут преследовать цель не массового выделения того или иного пигмента, а обнаружения его в клетках путем кристаллиза-

ции. В литературе известны микрохимические способы обнаружения „каротина“ либо „ксантофилла“ причем оба понятия смешиваются самым непозволительным образом. Таковы „кали-метод“ Molisch'a, „кислотный метод“ Frank'a и мой „резорциновый метод“. Адсорбционный анализ позволяет произвести критическую оценку этих методов.

Кали-метод (Molisch, 96, II). Исследуемая ткань погружается на один день или несколько суток в 40-процентный спирт, содержащий 20% KOH. Жидкость (в случае хлорофиллоносной ткани) постепенно окрашивается в зеленый цвет, в обесцвечивающихся же клетках появляются разнообразные, желтые или оранжевые, кристаллы, дающие известные красочные реакции, так называемых „липохромов“ (индиговая окраска под действием H_2SO_4, SO_3, HNO_3, Br . . .). Molisch толкует это явление так, что из двух (мнимых) компонентов хлорофилла зеленый („хлорофилл“), изменяясь, растворяется в щелочной жидкости, между тем как желтый („ксантофилл“, тоже „каротин“) выкристаллизовывается. Реакция кристаллизации не во всех объектах (зеленых листьях) удается: иногда вместо кристаллов появляются только желтые капли. С целью разъяснить сущность названной реакции, мною было предпринято несколько опытов с листьями Elodea canadensis и Lamium album. Привожу подробно один из них.

Из двух листьев Lamium вырезаны 2 центральных участка, общей площадью поверхности, равной 16 $см^2$, разрезаны на 32 квадратика и погружены в 20 $см^3$ жидкости Molisch'a. Начало опыта 10/IX 1907 г. Через двое суток позеленевшая жидкость сливается, заменяется свежей и подвергается хроматографическому анализу. Она разбавляется водою и встряхивается с эфиром, причем в последний переходят ксантофилловые пигменты, между тем как щелочные производные хлорофиллинов остаются в водной фазе. Жел-

тый эфирный раствор промывается двукратно водою и обезвоживается посредством встряхивания с безводным Na_2SO_4. В спектре поглощения заметны три полосы, из которых две первые лежат при λ 478—465 и 448—432 μμ. Эфир отгоняется в вакууме, и остаток растворяется в петролейном эфире. При взбалтывании получаемого раствора с 80-процентным спиртом желтый пигмент целиком переходит в спиртовую фазу; следовательно, каротин в нем отсутствует. Хроматографируя петролейно-эфирный раствор на $CaCO_3$, получаем три отдельные желтые зоны, первая из которых (верхняя) наиболее широкая. Принимая, что ксантофиллы не изменяются щелочами (см. II часть), мы должны усмотреть в I зоне *ксантофилл* β, во II и III *ксантофиллы* α' и α.

Обратимся теперь к листовым отрезкам, лежащим в жидкости Molisch'a, возобновленной 12/IX, представляющей 14/IX желтую, слабо зеленоватую, окраску, обусловленную, как показывает анализ, той же смесью ксантофиллов, что была обнаружена в первой зеленой порции щелочного реактива. Клетки мякоти листа оказываются содержащими в изобилии разнообразные по форме и по цвету (от бледно-желтого до красного с фиолетовым блеском) кристаллы (таблички, иглы, призмы). В целях определения природы этих кристаллических отложений листовые отрезки быстро промываются крепким спиртом, тонко растираются в ступке вместе с толченым стеклом и обрабатываются петролейным эфиром с примесью спирта. Получаемый желтый раствор оказывается в краусовской реакции „амфифазным", т. е. пигмент распределяется в обеих фазах (несколько значительнее в верхней петролейно-эфирной). Раствор промывается водою и хроматографируется на $CaCO_3$. Через прибор проходит желтый раствор эпифазного в краусовской системе пигмента, обладающего спектральными полосами λ 492-475 и 460-445 μμ и документирующегося, следовательно, как *каротин*. В хроматограмме же, проявленной бензолом, видны

три желтые зоны, из которых наиболее мощна нижняя, соответствующая *ксантофиллу* α.

Из приведенного опыта, равно как из подобных, произведенных над листьями Elodea, следует, что кристаллизации, получаемые по методу Molisch'а, отнюдь не соответствуют определенному пигменту; сам по себе щелочной реактив никоим образом не может служить для определения *каротина*, так как под его действием способны кристаллизоваться разнообразные пигменты ксантофилловой или липохромной группы. Механизм же реакции следующий. Едкий кали разрушает хлорофиллины, равно как жировые вещества протоплазмы или пластид, причем продукты реакции переходят в раствор. Ксантофиллы и каротин, не удерживаемые жировыми веществами, благодаря присутствию слегка растворяющей их среды (40% спирт), подвергаются процессу выкристаллизования, упомянутом на стр. 81, причем некоторая часть остается в растворе, в зависимости от степени растворимости того или иного пигмента в слабом спирте. Наименее растворим в нем каротин, почему его и нельзя обнаружить в жидкости, между тем как ксантофиллы (особенно β) растворяются в заметном количестве.

С увеличением пропорции алкоголя в жидкости Molisch'а должно быть возможно достигнуть в клетках кристаллизации только каротина.

К и с л о т н ы й м е т о д. По свидетельству Tschirch'а (84, стр. 92) Frank, обрабатывая цельные листья разведенными кислотами и кладя их затем в воду, получал через некоторое время во многих клетках красно-желтые иглы и желто-красные вязкие маслообразные массы. Molisch (96), повторяя эти опыты над листьями Elodea, нашел, что получаемые кристаллы совпадают по свойствам с возникающими при действии щелочного реагента.

Согласно исследованиям Tine Tammes (00), испробовавшей различные кислоты (HCl, HFl, винная, щавелевая и др.)

в концентрации 1—10%, кристаллы образуются через несколько часов или дней, в ткани, лежащей в кислой жидкости, или несколько времени после промывания от нее. Окраска кристаллов краснобурая, светлокрасная или желтокрасная.

Мною были поставлены опыты исключительно с 10-процентным раствором щавелевой кислоты над листьями Lamium album, Atriplex hortensis, Malva spec., Elodea canadensis, Sambucus nigra и Syringa vulgaris. После двухсуточного пребывания объектов в кислой жидкости, в клетках (за исключением двух последних объектов) можно было обнаружить довольно многочисленные, чешуйчатые, красного цвета с фиолетовым оттенком, кристаллы. Последние выступали особенно отчетливо и красиво в препаратах, просветленных концентрированным раствором резорцина (ср. Цвет, 02, Tswett, 00 II). Кристаллы сильно разнятся в окраске от желтых и оранжевых, получаемых под действием жидкости Molisch'a. Кроме названных кристаллов, в клетках имеются еще темнобурые, округлые или угловатые массы, представляющие, очевидно, смесь хлорофилланов (см. II часть), с примесью, быть может, измененных кислотою ксантофиллов (см. ниже). При обработке материала в течение нескольких дней щелочною жидкостью Molisch'a бурые массы растворяются, и в клетке остаются в качестве окрашенных тел только упомянутые красные кристаллы и, кроме того, желтые зернышки.

Порция листьев Lamium, обработанная 10-процентным раствором щавелевой кислоты в течение двух и затем жидкостью Molisch'a в течение нескольких дней, была растерта вместе с толченым стеклом и извлечена петролейным эфиром с примесью алкоголя. При взбалтывании желтого раствора с 80-процентным спиртом весь пигмент остался в верхней петролейно-эфирной фазе. При хроматографии раствора на $CaCO_3$ получилось несколько желтых зон, между тем как из прибора вытекал желтый раствор, имеющий спектр ка-

ротина. При пропускании через хроматограмму петролейного эфира с примесью алкоголя адсорбированные пигменты были освобождены; в смешанном их растворе заметны полосы поглощения λ 480 — 470 и 455 — 445, причем II значительно интенсивнее первой. Пигменты в краусовской системе эпифазны.

Из данного опыта следует, что при обработке листьев разведенной кислотою каротин не изменяется, между тем как ксантофиллы превращаются в эпифазные, по Краусу, производные. Судя по видимости, красно-фиолетовые кристаллы представляют из себя чистый каротин.

Механизм возникновения этих кристаллов несколько загадочен. Как известно, углеводород каротин в воде или в разведенных кислотах нерастворим (Arnaud, 85). Но пигменты содержатся в хлоропластах в аморфном виде, и можно допустить, что аморфный каротин слегка растворяется в подкисленной воде сам по себе или благодаря лабильному молекулярному соединению с каким-нибудь растворимым бесцветным спутником.

Р е з о р ц и н о в ы й м е т о д (Tswett, 00 I, Цвет, 00 I, 01 1, стр. 29). Хлорофиллоносная ткань погружается в концентрированный водный раствор резорцина (100—120 частей на 100 воды), который разжижает либо растворяет составные протопласта и липоиды, отложенные в хлоропластах (Tswett, 99 et 00 I, Ц. 99). Если к резорциновому раствору прибавить немного K_2HPO_4 (1 %), то соединенные липоиды сливаются в красивые зеленые шары (*хлороглобин*); в нейтральном же реактиве зеленая окраска сперва является диффузной, после чего, уже через несколько минут, начинают образовываться кустики желтых кристалликов, среди которых попадаются и красные. Кристаллы эти дают „липоциановую реакцию". (Zopf, 89), т. е. индиговую окраску под действием H_2SO_4. Подобные же кристаллы образуются, но очень медленно, в щелочном резорцине, в соседстве с хлороглобиновыми шарами.

С целью определения природы названных кристаллов произведен был мною следующий опыт. В нейтральный резорциновый раствор (120 : 100) были положены 8 октября разрезанные на кусочки листья Lamium; 9 числа в клетках находились многочисленные шарообразные кустики желтых кристаллов, а также красные призматические иглы; 10/IX количество кристаллов еще увеличилось и появились, кроме того, зеленые зернышки; 1 5/IX жидкость была слита, материал, промытый водою, был отжат в пропускной бумаге и по растирании извлечен петролейным эфиром. Часть пигмента адсорбировалась из раствора и явилась гипофазной в системе Крауса, между тем как неадсорбируемое вещество было эпифазно и дало спектр каротина.

Все вышеизложенное доказывает, что разобранные нами микрохимические методы, по крайней мере первый и второй, представляют из себя *групповые* реакции на так наз. „липохромы“ или „ксантофиллины“, которые, в свою очередь, составляют весьма искусственную группу веществ, содержащую как бескислородные, так и кислородные тела. Специфической реакцией на углеводород каротин (или, вернее, на каротины) может считаться только лишь обработка кислотами, да и она ненадежна, ибо разные неопределенные факторы могут задерживать кристаллизацию. В силу этого результаты Tammes (00) и позднейшие Kohl'a (02) относительно распространения каротинов в растительном царстве—результаты, основанные на применении методов Molisch'a и кислотного, не имеют значения.

Вопрос нуждается в переработке, в которой главная роль принадлежит адсорбционному анализу. Последний позволяет анализировать даже незначительные количества пигментов и характеризовать их по трем категориям спектральных свойств, отношения к растворителям и адсорбционных свойств (адсорбируемость, положение в адсорбционном ряду, скорость миграции).

Глава IX

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ХРОМОФИЛЛОВ

Количественный анализ хромофиллов в применении к физиологическим задачам (стр. 65 и 78) не может прибегать к весовому определению естественных пигментов или их производных, и это по двум причинам: отсутствию соответственных методов отделения веществ в достаточном количестве и необходимости ограничиваться исследованием небольших количеств пигментов. Надлежащий метод, следовательно, титриметрический.

Напрашивается мысль, нельзя ли хроматографический или хроматоскопический метод превратить в хроматометрический, выражая количество компонентов смеси высотой обусловливаемых ими адсорбционных зон, т. е., так сказать, определяя их в „адсорбционных эквивалентах". Опыты, произведенные мною в этом направлении, не дали удовлетворительных результатов, да и теоретическое рассуждение показывает, что предполагаемой пропорциональности между количеством определенного пигмента и высотой занимаемого им столба адсорбента не существует. Коэффициенты адсорбции, как мы видели (стр. 88), зависят от концентрации раствора и не просто пропорциональны ей. Кроме того, могут интерферировать бесцветные вещества, изменяя коэффициенты адсорбции (стр. 143). Таким образом, измерение относительной или абсолютной высоты адсорбционных зон может дать только грубое понятие об относительном количестве присутствующих веществ. Остается, следовательно, спектроколориметрический или спектрофотометрический метод. Об условиях и точности спектрофотометрических измерений будет речь в главе XI, здесь же рассмотрим условия количественного извлечения пигментов из тканей и отделения их друг от друга. Последнее должно происходить на основании адсорбционного анализа.

Полное извлечение спирторастворимых пигментов из тканей легко произвести метиловым или этиловым алкоголем, но из этих растворов перевести пигменты сполна в пригодные для адсорбции растворители трудно. При взбалтывании постепенно разбавляемого водою спиртового экстракта с сероуглеродом или петролейным эфиром часть пигмента выпадает коллоидально в водноспиртовой фазе и образует трудно разрешающуюся эмульсию. Метод же выпаривания спирта и растворения остатка в надлежащей жидкости негоден, ввиду того, что раствор обязательно содержит воду; во время дестилляции относительная концентрация этой воды все возрастает, и действие на пигменты содержащихся в растворе электролитов усиливается, чему содействует повышенная температура. Полного извлечения тканей бензолом, сероуглеродом или петролейным эфиром с примесью спирта трудно или даже невозможно добиться (стр. 120). Самым рациональным приемом поэтому является следующий. Тщательно растертая с наждаком или толченым стеклом ткань обрабатывается (при дальнейшем растирании в ступке) эфиром или смесью эфира со спиртом, с заменою растворителя до тех пор, пока он не перестанет окрашиваться. Эфирный экстракт взбалтывается два-три раза в разделительной воронке с водою, для удаления из него электролитов (солей, кислот) и спирта, и обезвоживается безводным Na_2SO_4. После этого эфир легко отгоняется в вакууме, и остаток, растворенный в сероуглероде, бензоле или петролейном эфире, подвергается хроматографическому разложению.

Задача количественного анализа требует полного обособления зон в хроматограмме так, чтобы каждая зона была вполне однородна и не налегала на соседнюю. Такому обособлению зон содействует, как мы видели, миграция их под влиянием тока подходящего растворителя. Тем не менее, может случиться, что благодаря неровности поверхности разделяющей две остающиеся смежными зоны, механическое

их разделение ножом не вполне точно удается. Подобный случай встречается в анализе хлорофилла при разделении зон хлорофиллинов α и β. Затруднение это можно обойти, подвергая спектроколориметрическому определению не хлорофиллины, а их ближайшие кислотные производные, хлорофилланы α и β, в которые они превращаются при предварительной обработке ткани щавелевой кислотой (см. II часть). В хроматограмме измененного таким образом хлорофилла (из петролейно-эфирного раствора) зоны хлорофилланов являются не смежными, а разделенными зоной ксантофилла (стр. 134). При механическом отделении хлорофиллановых зон примесь ксантофилла в них не будет иметь значения, так как спектрофотометрическое определение хлорофилланов можно (и удобнее) произвести в красных лучах, ксантофиллами заметно не поглощаемых.

Тесно соприкасаются тоже в хроматограммах хлорофилла зоны ксантофилла β и хлорофиллина β. Для титрации первого можно поступить следующим образом. Обе зоны вырезываются вместе и извлекаются алкоголем; обрабатывая раствор едким кали, мы превращаем хлорофиллин в нерастворимый в эфире дериват и, следовательно, можем легко отделить ксантофилл, переводя последний в эфир.

Наиболее легко количественное определение каротина на основании приема дробной адсорбции (стр. 143) в том случае, когда он является единственным неадсорбируемым компонентом смеси, что, конечно, должно быть всегда проверено.

Глава X

ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПИГМЕНТОВ

Первым условием точного химического исследования является,—не лишне повторить этот трюизм,—обладание объектом исследования, т. е. приготовление вещества в чистом

виде. О методах, пригодных для этой цели применительно к фотосинтезным пигментам, была речь в предыдущих главах. Специально адсорбционный метод дает нам возможность получения пигментов в оптически чистом виде. Химическая же чистота пигментов, выделяемых по хроматографическому методу, по существу может быть под сомнением, ввиду того что бесцветные примеси в адсорбционных зонах (вследствие, например, молекулярного соединения с пигментом) не могут быть обнаружены глазом. Для контроля полной химической чистоты нужно прибегать к опытам перекристаллизации или „перевыделения" (Umscheiden), или дифференциального растворения, одним словом, проверять постоянство состава вещества, неразложимость его физическим путем на фазы различного состава. Само кристаллическое состояние вещества, разумеется, не является гарантией его химической чистоты, индивидуальности, равно как и отсутствие кристаллической формы не доказывает неоднородности препарата.

Здесь не место разбирать методы химического исследования фотосинтезных пигментов. Методы эти те же, какие применяются в исследовании остальных органических веществ: элементарный анализ, определение кислотных, основных, или иных специальных функций, окисление, редукция, разложение и синтез. Не лишним будет зато изложение нескольких критических соображений относительно методики существующих в области хромофиллов химических исследований. Они ограничиваются, впрочем, до сих пор хлорофиллом.

Нужно сказать, как ни звучит это парадоксально, что современная выступающая с большими претензиями „химия хлорофилла" лишена реального объекта, так как исследуемое ею, обладающее 7 полосами поглощения, „зеленое вещество" *не существует*, и концепт о нем установился совершенно произвольно (см. II часть).

Не имея в руках мифического „хлорофилла“ и отчаиваясь в возможности получения его в чистом, неизмененном виде, большинство исследователей довольствовалось исследованием более доступных приготовлению дериватов его, из природы которых делались заключения о природе исходного естественного пигмента. Так, например, в новейшее время, Willstätter[1] (06) и W. und Hocheder (07), подвергая хлорофилловую вытяжку продолжительному действию щавелевой кислоты, получили осадок вещества, именуемого им *феофитином*, содержащего в эфирном соединении особый спирт—*фитол*,[2] но не содержащий магния. Действуя же на хлорофилловую вытяжку едким кали, цюрихский ученый получил препарат, содержащий магний, но фитола не заключающий. Отсюда делается вывод, что „хлорофилл“ есть сложный эфир хромофорной группы (фитохромин) с фитолом и содержит магний. Все это возможно; где же, однако, доказательство или просто вероятность того, что фитол предсуществует в исходном пигменте (т. е. в хлорофиллинах), а не вступает в состав „феофитина“ во время трехдневной обработки сложной хлорофилловой вытяжки щавелевой кислотой? Как увидим впоследствии, есть даже и противоположное указание.

Очевидно, что „химия хлорофилла“, точнее—химия хлорофиллинов, до тех пор не будет в состоянии достичь положительных, достоверных результатов, пока, увлекаясь не-

---

[1] Willstätter (06 II, S. 48) высказывает такое мнение: Die Veränderung des Chlorophylls durch Säuren wird sich aus der Zusammensetzung der Verbindungen ergeben, die es mit Alkali liefert und umgekehrt eignet sich der Vergleich dieser Substanzen mit den Umwandlungsprodukten aus sauren Lösungen, um die Einwirkung der Alkalien auf das Chlorophyll aufzuklären.

[Превращение хлорофилла под воздействием кислот стоит в связи со строением соединений, образующихся из него под влиянием щелочей, и, наоборот, сопоставление этих последних соединений с продуктами кислотной обработки выявляет сущность воздействия щелочей на хлорофилл. — Пер. Ред.].

[2] Фитол этот освобождается при омылении феофитина едким кали.

замысловатой работой приготовления, описания и элементарного анализа всевозможных сомнительного происхождения и однородности дериватов, она не приступит к более трудному и хлопотливому, но вполне возможному обследованию естественных пигментов.

Глава XI

ОПТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПИГМЕНТОВ

Из числа оптических свойств хромофиллов и их составных пигментов существенное значение для химии и для физиологии имеют лишь светопоглощение и присущая некоторым из названных пигментов флюоресценция. Познавание этих свойств, особенно первых, необходимо для характеристики и отожествления пигментов, равно как и для понимания энергетической их роли в жизни организма. Физиологические задачи, кроме исследования оптических свойств отдельных пигментов в растворах и in substantia, требуют еще определения свойств отложенной в фотосинтезных органитах смеси пигментов, составляющей хромофилл.

Результаты исследования отдельных пигментов, сопоставленные с данными касательно хромофилла in situ, позволяют составить понятие об оптическом распределении труда в последнем.

Под спектральным обследованием какого-нибудь вещества следовало бы, строго говоря, понимать изучение его поглотительных и отражательных свойств по отношению к всевозможнейшим электромагнитным волнам, хотя бы в области, лежащей между ультрафиолетовыми лучами Schumann'a ($\lambda < 100$ $\mu\mu$) и лучами Hertz'a ($\lambda > 4\,000\,000$ $\mu\mu$).

Насколько уместно довольствоваться, как это обыкновенно делается, исследованием в видимой части спектра, с присоединением (с помощью фотографической пластинки)

прилегающей ультрафиолетовой части, это вопрос, требующий обсуждения. Чем обширнее исследованная область кривой поглощения какого-нибудь вещества, тем, очевидно, полнее характеризуется последний. Можно представить себе два пигмента, имеющие одинаковый спектр поглощения в видимой части спектра, но отличающиеся в ультрафиолетовой или ультракрасной областях. Такой случай представили бы два пигмента, обладающие каждый двумя различными хромофорными группами, одна из которых (обусловливающая поглощение в видимом спектре) была бы одинакова в обоих пигментах. Обыкновенное спектроскопическое исследование привело бы в таком случае к ошибочному отожествлению веществ. Во избежание подобных ошибок спектроскопическое отожествление должно быть проверено на основании иных свойств, причем отличными критериями являются адсорбционные свойства (положение в адсорбционном ряду, скорость миграции). При таком контроле фотографическое исследование ультрафиолетового спектра отнюдь не является необходимым.

Познание поглощений хромофилловых пигментов в ультрафиолетовой части спектра для энергетики фотосинтеза, повидимому, большого интереса не представляет, так как, согласно расчетам Langley (01), вся область лучей длины волн $< 400\ \mu\mu$ составляет не более 1/100 совокупной солнечной энергии.

Исследование извлеченных из организма пигментов

Качественное спектральное исследование. Для качественного определения спектров поглощения исследователь располагает в настоящее время двумя методами спектроскопическим и спектрофотографическим.

Спектроскопическое исследование. Из различных аппаратов: спектроскоп Steinheil'a, микроспектральные аппараты Sorby-Browning'a и Engelmann'a (с рефракционным или

диффракционным спектром), спектральный окуляр Zeissa. Наиболее удобным и вместе с тем вполне удовлетворительным для целей хроматологии является прибор Zeiss'a, видоизменение аппарата Sorby-Browning'a, употреблявшегося в первоначальном или усовершенствованном виде многочисленными исследователями (Sorby, Kraus, Pringsheim, Nebelung, Reinke, Tschirch, Wegscheider, Mann, Monteverde, Tswett, Willstätter и др.). Названный прибор обладает призмой сравнения и онгстремовской скалой, позволяющей отсчитывать непосредственно в длинах волн границы полос поглощения.

Благодаря сравнительно незначительной дисперсии в приборе Zeiss'a спектр получается очень яркий, и границы полос поглощения выступают очень отчетливо. Представим себе, действительно, кривую светопоглощения в узком и широком спектрах. В последнем наклонности кривой по отношению к оси абцисс будут, очевидно, менее крутыми, чем в узком спектре, так что, при известном растяжении спектра, разницы светопоглощения в последовательных участках могут оказаться ниже порога ощущения; при таких условиях границы полос поглощения будут ускользать от определения. Указанное преимущество узкого спектра окупается меньшей точностью в отсчитывании спектральных параметров на шкале. В цейссовском приборе промежутки между последовательными делениями шкалы соответствуют 10 $\mu\mu$, и единицы приходится оценивать на-глаз. В красных лучах, благодаря близости делений, точность отсчета не превышает 22 $\mu\mu$. Недостатком цейссовского прибора является невозможность выделить для наблюдения тот или иной участок спектра и таким образом увеличить чувствительность глаза к разницам интенсивности света. Последнее особенно желательно при исследовании в синих лучах, где, благодаря большей дисперсии, границы полос поглощения выступают менее отчетливо, а потому уместно уменьшить порог чувствительности. С этой целью применяется мною

свет, прошедший через раствор купраммония. Для исследования же в красных лучах (в области I полосы поглощения хлорофилла) свет пропускается через красное стекло.[1]

Аппарат, применяемый мною с 1902 г. для спектроскопических исследований, устроен следующим образом (см. табл. II, рис. 4, схема вертикальной проекции). Спектроскоп, состоящий из микроскопного штатива *M* и спектрального окуляра Zeiss'а (Z), помещается, по примеру Flögel'а и Engelmann'а (80, p. 577) в темном ящике *abcd*, стоящем на четырех ножках и открытом с одной стороны, которая завешена куском черного сукна, разрезанным по вертикальной срединной линии. Штатив покоится на деревянной подставке *C* на такой высоте, чтобы столик его приходился как раз под нижнюю стенку ящика, снабженную отверстием для пропускания верхней части штатива. Освещение производится посредством ауэровской лампы[2] *L*, свет которой концентрируется посредством большой, наполненной водой или раствором купраммония, круглой колбы *B* и направляется на зеркало микроскопа. Исследуемая жидкость помещается в обыкновенном пробирном цилиндре, который вставляется в трубу микроскопа. Объектива не привинчивают, а дно пробирки покоится на пробуравленной цилиндрическим отверстием (диаметр 10 мм) пробке (*b*), зажимаемой между трубой микроскопа и столиком.

Лучи света, попадающие в прибор, испытывают преломление на вогнутом дне пробирки, и ход их в жидкости не является параллельным. Для фотометрического исследования различной высоты слоев жидкости такое устройство было бы непригодно; для качественного же исследования оно вполне удовлетворительно.

---

[1] Стеклянные световые фильтры для определенных участков спектра изготовляет фирма Schott u. C° в Иене.

[2] Распределение энергии в ауэровском (вельсбаховском) свете: Rubens, 05.

Освещение шкалы спектроскопа производится посредством диспозиции, схематически изображенной на рис. 5 табл. II (горизонтальная проекция аппарата в уровне спектрального окуляра): *abcd* — стенки темного ящика; *o* — окулярная диафрагма анализатора; *s* — боковая трубка со шкалой Онгстрема; *E* — осветительный прибор, состоящий из коленчатой металлической трубы, заключающей призму *p*. Исходящий от лампы *L* свет отражается зеркальцем *m* в трубу и, испытывая полное отражение на гипотенузной грани призмы, попадает на шкалу спектрального окуляра. Незначительный поворот последнего направо или налево позволяет ослабить или совсем исключить освещение шкалы, чтó весьма желательно при наблюдении очень затемненных участков света, где блеск делений шкалы уменьшает чувствительность глаза для различий в интенсивности света.

Правильное положение шкалы относительно спектра контролируется часто посредством линии *D*, при помощи спиртовой лампочки, питаемой раствором салицилового натрия.

Спектроскопическое исследование должно производиться в высоком спектре, т. е. при длинной щели коллиматора. Действительно, я нашел, что слабые и узкие полосы поглощения, еще заметные в высоком спектре, в низком становятся совершенно неуловимы. Психофизиологическое основание этого явления осталось мне неизвестным.

Спектрофотографическое исследование. Благодаря панхроматическим пластинкам возможно в настоящее время удобное фотографическое исследование не только правой, сине-фиолетовой, но и левой области спектров поглощения, начиная от красных лучей. Фотографическое исследование имеет то преимущество, что фотограммы могут сохраняться и подлежать чужому исследованию, между тем как оптограммы на сетчатой оболочке, с которыми имеет дело наблюдатель при спектроскопическом исследовании,

требуют немедленного перечисления в длинах волн, причем трудно избежать некоторой субъективности. Поскольку, однако, спектроскопические измерения имеют целью сравнение (отожествление или спецификацию) веществ, непосредственное сравнение двух спектров (при помощи компаратора) в сомнительных случаях дает исследователю не менее достоверные результаты, чем сравнение фотограмм. Преимущество последних ограничивается их воспроизводимостью и доступностью всеобщему контролю.

Количественное спектральное исследование. Спектроскопическое и спектрофотографическое наблюдения позволяют установить с удовлетворительною точностью лишь границы полос поглощения, что же касается интенсивности поглощения в полосах или между ними, наблюдения эти дают только относительные указания, да и то иногда ошибочные. Оценка относительной интенсивности двух полос поглощения может считаться правильной только при сравнении двух близколежащих участков спектра, между которыми (в падающем свете) не существует большой разницы в силе света. В противоположном случае слабое поглощение в слабо светящемся участке спектра может казаться превышающим более значительное поглощение в ярком участке. Подобная же ошибка может случиться, если для сравниваемых участков чувствительность глаза неодинакова.[1] Никогда не нужно забывать, что, как отлично выражается Ebert (p. 140), „при всех наблюдениях, производимых глазом, сетчатая оболочка наблюдателя входит в качестве составной части в анализирующий аппарат“. Для более точного количественного исследования спектров имеются два метода: спектрофотометрический и спектроактинометрический.

[1] Чувствительность глаза обыкновенно имеет максимум в зеленых лучах (Ebert, Langley, 89, Tufts).

Спектрофотометрическое исследование. Весьма распространено кажущееся правдоподобным мнение, что фотометрическое исследование точнее спектроскопического не только для количественного, но и для качественного определения спектров. Правильность этого взгляда, однако, очень условна. В действительности бывает иногда как раз наоборот. Не нужно забывать, что фотометрические определения, в силу практической необходимости, происходят обыкновенно в спектре, гораздо менее чистом, чем спектроскопические наблюдения. Так, например, говоря уже только о новейших, употребительных приборах (спектрофотометр König'a, видоизмененный Martens'ом и Grünbaum'ом, микроспектрофотометр Engelmann'a, мерцательный спектрофотометр Tufts'a), мы видим, что минимальная ширина объективной щели не менее 0.1 мм (Martens и Grünbaum, p.993). В приборе Engelmann'a наиболее пригодная ширина щели — 0.2 мм, при которой, по моему определению, линия *D* распространяется на промежуток шкалы, равный 7 $\mu\mu$. В приборе Martens'a и Grünbaum'a распространение монохроматического света равняется в среднем (при минимальной ширине щели) 4 $\mu\mu$. Houstoun, производивший недавно с помощью последнего прибора фотометрические измерения в спектре хлорофилла, применял ширину объективной щели, при которой, как видно из сообщаемых им данных (стр. 542), распространение монохроматического света равнялось 9.6 $\mu\mu$ для лучей λ 550, 18 $\mu\mu$ для лучей λ 650 и 22.8 $\mu\mu$ для лучей λ 700. Tufts, работая со своим мерцательным спектрофотометром, объективную щель брал ширины, дозволяющей распространение монохроматического света на интервал 6 $\mu\mu$. Ширина объективной щели не имела бы значения при работе в монохроматическом свете; для установления же полной кривой поглощения пигментов необходимо пользоваться полихроматическим светом, т. е., в случае широкой щели, работать в весьма неоднородном, нечистом спектре. „Эта неоднородность, — пишут

Martens и Grünbaum (loc. cit., p. 993), — разумеется, не вредит, когда поглощение изменяется с длиной волн так мало, как, например в почерневших сухих фотографических пластинках. Во всех других случаях, а именно при круто поднимающихся или сильно изогнутых кривых поглощения, получаются очень существенные недочеты".

Вследствие упомянутой нечистоты спектра должна происходить некоторая нивелировка измеряемой кривой поглощения; полосы поглощения становятся более или менее расплывчатыми. Слабые и узкие полосы, хорошо выступающие в более чистом спектре спектроскопа, становятся неуловимыми при фотометрическом исследовании. На этом факте основано учение Reinke (86I, 87) о „субъективных полосах поглощения", несостоятельность которого была доказана Stenger'ом [1] (87).

Что касается абсорбционных или экстинкционных коэффициентов, то, при определении их, работая в непрерывном спектре, следует иметь в виду два источника погрешностей. Первый из них, изменчивый, происходит от изменчивости чувствительности глаза к количественным разницам освещения, чувствительности, неодинаковой в разных лучах спектра, неодинаковой у различных наблюдателей и изменяющейся в зависимости от состояния покоя или усталости зрительного аппарата. Второй источник постоянных ошибок

[1] Stenger пишет между прочим (стр. 125):

Es ist daher, wenn es sich nicht um vergleichende Messungen handelt, sondern um die Fixierung der Lage der Absorptionsmaxima, entschieden bequemer und sicherer statt des Glan'schen Photometers einen guten Spektralapparat zu benutzen, ganz abgesehen davon, dass unser Auge in einem Absorptionsspektrum noch Bänder zu erkennen kann, welche photometrisch nicht nachweisbar sind.

[Ясно, что если дело не в получении сравнительных измерений, а в установлении максимума абсорбции, то удобнее и вернее пользоваться вместо глановского фотометра хорошим спектроскопом, тем более что наш глаз может различать в спектре абсорбции еще такие полосы, которые не поддаются фотометрическому определению.— Ред.]

зиждется в нечистоте спектра. О величине возможных в этом отношении погрешностей дает понятие следующее элементарное рассуждение [1] (Tswett, 07 IV).

Допустим, что при спектрофотометрическом исследовании применяется источник света, испускающий с равной интенсивностью лучи длины волн n, $n+1$, $n+2\ldots$ Ширина коллиматорной щели аппарата (с нормальным спектром) такова, что свет определенной длины волн распространяется на промежуток шести делений λλ. Лучи категории $n+6$ распределятся, следовательно, на интервал скалы $n+3$ до $n+9$, лучи $n+7$ на интервал $n+4$ до $n+10$ и т. д. Для каждого участка наблюдаемого спектра можно определить состав наличного в нем света. Расположим теперь перед щелью абсорбирующее тело, обладающее, положим, при данной толщине коэффициентами ослабления (I/I_0), равными 0.5 для лучей $n+11$ до $n+15$ и 0.9 для лучей соседних участков. В следующей табличке сопоставлены действительные и спектрофотометрически определенные коэффициенты ослабления света, при единичной и двойной толщине слоя абсорбирующего тела.

	I/I_0	$n+6$ до $n+10$	$n+11$ до $n+15$	$n+16$ до $n+20$
	Единичный слой			
I	дано	0.900	0.500	0.900
II	наблюдено	0.831	0.637	0.831
	Двойной слой			
III	дано	0.810	0.250	0.810
IV	наблюдено	0.714	0.442	0.714
V	вычислено из II . . .	0.691	0.406	0.691

[1] Математическая разработка вопроса у Runge.

Как видно, недостаточная чистота спектра может иногда являться причиной весьма крупных ошибок в определении коэффициентов ослабления, и вычисленные на основании последних абсорбционные отношения Vierordt'a оказались бы, несогласно с законами Lambert'a и Beer'a, зависящими от толщины и концентрации поглощающего слоя.

К вышеупомянутому источнику крупных погрешностей, наличному при исследовании всех пигментов с явными полосами поглощения, присоединяется в случае флюоресцирующих пигментов, например хлорофиллинов, еще другой, насколько мне известно, доселе не отмеченный. То, что мы называем спектром поглощения хлорофиллина (или другого флюоресцента), есть в действительности комбинированный спектр поглощения[1] и излучения, так как возбуждаемый всеми лучами, поглощаемыми хлорофиллином, красный свет флюоресценции отчасти попадает в спектральный аппарат, вследствие чего поглощение соответственных красных лучей должно казаться меньше, чем оно есть в действительности.[2] Для того чтобы получить точное значение коэффициентов поглощения в красных лучах, было бы необходимо работать в совсем однородном монохроматическом свете, да и тогда еще часть, хотя, может быть, и ничтожная, поглощаемой энергии излучалась бы в виде красных лучей иного периода, которые попадали бы в анализатор.

[1] Следовало бы прибавить: отражения, хотя при исследовании очень разведенных растворов, элективным отражением, о котором будет речь впоследствии, можно пренебречь.

[2] Величина коэффициента абсорбции должна и в этом случае зависеть от толщины исследуемого слоя. Примером могут служить исследования Wick'a (07.I), над светопоглощением спиртовых растворов резоруфина. При $\lambda = 589$, соответствующей максимуму света флюоресценции, коэффициент абсорбции, определенный при толщине слоя в 1.075 см, оказался равным 0.8354, между тем как при двойной толщине слоя получилось 0.6979. Для иных длин волн коэффициенты обеих серий оказались близко совпадающими.

Из всего вышеразобранного видно, насколько критически следует относиться к спектрофотометрическим определениям. Если мы припомним, что спектрофотометрические кривые, поскольку они должны быть верными выразительницами действительных кривых светопоглощения, нужно вычислять из многочисленных наблюдений при разных концентрациях[1] (или, лучше, при разных толщинах слоя, так как закон Beer'a подвержен многочисленным исключениям) и что эти вычисления, основанные на допущении постоянства абсорбционных коэффициентов, связаны неизбежно с крупными погрешностями, то приходится заключить что значение спектрофотометрических кривых весьма условное, и что для отожествления или спецификации двух пигментов, они не имеют преимущества над простым спектроскопическим сравнением. Точное спектрофотометрическое сравнение двух веществ должно было бы производиться одним и тем же исследователем, при помощи одного и того же прибора, при одинаковом освещении, одинаковой ширине объективной и окулярной щелей, при одинаковой концентрации пигмента и одинаковой толщине слоя.

Актинометрическое исследование. Распределение энергии в спектре прошедшего через какое-нибудь тело света можно исследовать посредством линейного термоэлемента Rubens'a, радиометра или болометра (ср. Winkelmann, 06). Эти исследования требуют более сложной аппаратуры, чем фотометрические, и, кроме того, очень постоянного источника света. Но зато они могли бы дать гораздо более точные результаты, предполагая работу в чистом спектре. Особенно много обещает болометрический или, лучше, болографический метод Langley'a (94,00), дозволяющий автоматическое записывание

[1] Для каждого участка спектра спектрофотометрическое определение рекомендуется производить при толщине слоя, обусловливающей поглощение приблизительно 3/4 света (Kayser 05 III, p. 50).

полной кривой энергии, вплоть до ультрафиолетовых лучей.[1] Систематического применения спектроактинометрическое исследование в области хромофиллов еще не нашло. Имеются лишь разрозненные, мало известные указания. Болометрическое исследование раствора хлорофилла в руках Donatha (96) дало парадоксальный результат: первая полоса поглощения совсем не обнаружилась. Причина этой неудачи заключается, между прочим, в том, что автор производил измерения в слишком отдаленных пунктах кривой поглощения. От λ 638 μμ он прямо перескочил на λ 675, минуя максимум поглощения I полосы. Gulik (0,7), пользуясь линейным термоэлементом Rubens'a, произвел измерения в спектре спиртовой вытяжки хлорофилла между λ 613 и 705 и получил следующие величины поглощения (*A*) для двух различно концентрированных растворов I и II (величины эти исправлены на поглощение растворителем).

	λλ	705	688	680	673	666	659	652	638	625	613
A(%)	I	1.05	35.5	54	**60**	**61**	53	42.5	34	28	**35.5**
	II	1.75	51	73	**81**	**79**	75	63	51	46	**56**

Как видно, I полоса хлорофилла выступает отчетливо, обрисовывается и начало II, несмотря на то, что автор работал в очень нечистом спектре (ширина коллиматорной щели равнялась 0.8 — 0.9 мм). Еще лучше выступает I полоса в кривой, которую Coblentz (см. Nichols a. Merrit 04 I) определил с помощью радиометра для спиртового раствора хлорофилла (к сожалению, кислотно измененного) в области λ 625 — 1600 μμ. Заметен, кроме того, незначительный максимум поглощения при λ 740, после чего поглощение становится неуловимым приблизительно до λ 900, где кривая начинает постепенно подниматься.

[1] Как показал Pflüger (04), возможно помощью термоэлемента Rubens'a исследовать даже и ультрафиолетовую часть спектра.

Во всем предыдущем речь шла о количественном исследовании светопоглощения *в растворах* пигментов. Аппаратура, пригодная для исследования пигментов *in substantia*, в аморфном или кристаллическом виде, такая же как вышеупомянутая, в измерения же приходится внести новые поправки. Не говоря уже о плейохроизме кристаллов, поглощение которых зависит от ориентации проходящего луча по отношению к кристалловым осям, исследование даже аморфных веществ встречается с трудно преодолимыми препятствиями. Если сравнивать фотометрически два первоначально равносильные луча света, прошедшие в перпендикулярном направлении: один через слой разбавленного раствора пигмента, другой через равной толщины слой чистого растворителя, — можно разницу между ними отнести на счет поглощения пигментов, пренебрегая *элективным отражением* лучей на поверхности пигментного раствора. Отражательная способность R какого-нибудь тела, т. е. отношение интенсивностей света отраженного к падающему, при угле падения, равном нулю, выражается по данным электромагнитной теории, формулой[1]

$$R = \frac{n^2(1+\chi^2)+1-2n}{n^2(1+\chi^2)+1+2n},$$

где n есть показатель преломления данного периода света, а χ — употребительная в оптике металлов величина, характеризующая поглощение, так называемый показатель абсорбции. В телах с нормальной дисперсией n возрастает с убывающей длиной волны. В веществах же с аномальной дисперсией, каковыми являются, например, металлы или обла-

[1] Для веществ вполне прозрачных для данного периода лучей (т. е., где $\chi = 0$) формула эта переходит в известную формулу Fresnel'а $R = \left(\frac{n-1}{n+1}\right)^2$.

дающие полосами поглощения пигменты, кривая показателей преломления поднимается в области сильно поглощаемых лучей, представляя в их соседстве резкие максимумы (ср. например, Drude, p. 382). Следствием является усиленное отражение в областях поглощаемых лучей, могущее достигать очень значительной величины. Так, например, при падении желтого света (λ 589) на металлический натрий отражается 99.7% (Drude, p. 346). При исследовании разведенных растворов пигментов можно, пожалуй, повторяю, пренебречь элективным отражением,[1] при исследовании же концентрированных растворов или веществ in substantia игнорировать это свойство, очевидно, невозможно: исследуемый количественно так называемый спектр поглощения в этом случае—просто спектр пропускания, и только специальное, сопряженное с немалыми трудностями исследование может выяснить, какова для разных лучей доля отражения и какое количество недостающего в проходящем спектре света следует отнести на долю поглощения.

Исследование флюоресценции. Природа света флюоресценции и возбуждающих ее лучей может, так же как спектр поглощения, служить для характеристики пигментов. Двойной свет флюоресценции (как, например, двойная красная флюоресценция растворов хлорофилла) может вообще считаться признаком наличности двух флюоресцентов. При

---

[1] Аномальная дисперсия в растворах хлорофилла была наблюдена Kundt'ом (71) и Sieben'ом (79). Последний определил показатель преломления лучей λ 589 в спирте и в спиртовом растворе хлорофилла и получил для первого величину 1.363300, а для второго 1.36707. Разница незначительная, стоило бы, однако, вычислить показатель абсорбции χ для данных лучей в исследованном растворе и убедиться, действительно ли R является величиной незначительной.

Еще интереснее было бы определение n и χ для сильно поглощаемых лучей λ 650-670. Исследованный Sieben'ом свет как раз принадлежит одному из минимумов поглощения.

наблюдении в темном помещении отбрасываемого на поверхность флюоресцирующей жидкости интенсивного спектра получается, так сказать, негатив спектра поглощения флюоресцента, так как ярче всего светятся те участки жидкости, на которые падают наиболее поглощаемые ею лучи. Неоднородность света флюоресценции в разных полосах свечения и несовпадение последних с полосами поглощения жидкости указывают на то, что в растворе имеется несколько флюоресцентов и одно или несколько нефлюоресцирующих веществ. Исследование на флюоресценцию может таким образом играть эвристическую роль.

О наличности флюоресценции никоим образом нельзя, заключать, как это часто делается, на том основании, что жидкость имеет неодинаковый цвет в отраженном и в проходящем свете, что хлорофилловый раствор, например, отливает красным светом при рассматривании его на темном фоне. Такой дихроизм мог бы, и при отсутствии флюоресценции, быть обусловлен элективным отражением наиболее сильно поглощаемых лучей, как, например, в растворах фуксина; с другой стороны, флюоресценция указанным способом в слабых растворах не обнаруживается. Необходимо прибегнуть к опыту Тиндалля, наблюдая со стороны при устранении всякого постороннего света траекторию пучка концентрированного света в жидкости. Для этой цели пригоден мой, упомянутый уже раньше (стр. 105), *люминоскоп*. Посредством николевой призмы можно отличить неполяризованный свет флюоресценции от поляризованного света опалесценции.[1] Для исследования флюоресценции, возбуждаемой фиолетовыми и ультрафиолетовыми лучами, надо вместо стеклянных пробирок применять кварцевые.

[1] Игнорированием надлежащих критериев флюоресценции объясняются многочисленные ошибочные данные литературы, вроде, например, утверждения R. Dubois (см. Villard, 07, p. 119), что раствор хлорофилла не флюоресцирует, а только дихроичен.

Для точного исследования природы света флюоресценции и распределения в спектре полос флюоресценции удобным представляется прибор Hagenbach'a.

Весьма интересным было бы исследование хромофиллов на фиолетовую флюоресценцию посредством фотографического метода Stark'a. Таковая была найдена упомянутым автором (07 I и II), между прочим, для эритрозина и цианина, и ею он объясняет сенсибилизирующее влияние пигментов на бромосеребряную пластинку.

Для обнаружения флюоресценции в нерастворенных веществах пригоден метод деривированного спектра Stokes'a (52). На поверхность исследуемого вещества отбрасывается яркий, очень низкий, линейный спектр и рассматривается через вторую призму, преломляющее ребро которой располагается параллельно спектру. Исходящий из каждой точки спектра свет, если он, кроме отраженного, содержит еще свет флюоресценции, при данных условиях разлагается; таким образом становится возможным обнаружить даже слабую флюоресценцию. Этим методом неоднократно была доказана все еще отрицаемая некоторыми авторами красная флюоресценция зеленых листьев.

Исследование пигментов в тканях

Важное значение представляют для физиологии фотосинтеза три следующих вопроса:

1) Какое количество света того или иного периода поглощается хромофиллом хотя бы при перпендикулярном освещении ассимилирующего органа, соответственно условиям исследования разложения CO_2 в зеленых листьях.

2) Какое количество света поглощается хромофиллом при естественном освещении, т. е. при одном диффузном свете, исходящем из всех точек небесного свода, или с прибавлением меняющего свое направление прямого солнечного света.

3) Какая часть из общей суммы поглощенного хромофиллом света приходится на каждую отдельную его составную.

Последний вопрос важен, так как возможно, что не все компоненты энергетически участвуют в процессе фотолиза углекислоты.

Качественные и количественные свойства хромофиллов в среде их физиологической деятельности недоступны непосредственному определению. Приходится устанавливать их путем вывода, причем неизбежна значительная неуверенность. Благодаря прерывному строению ассимиляционных органов точное решение даже первой из упомянутых задач встречается с непреодолимыми затруднениями. Падающий перпендикулярно на поверхность листа луч света отчасти отражается уже диффузно на первой поверхности кутикулы, а затем испытывает внутри листа бесчисленные отражения и преломления на различно наклоненных граничащих поверхностях между протопластами и клеточными оболочками, цитоплазмой и хлоропластами, оболочками и межклетниками, наполненными воздухом. Часть света отражается обратно перпендикулярно плоскости листа и под всеми иными углами,[1] другая рассеивается в плоскости ткани, третья рассеивается во все направления под нижней стороной листа, обращенной к щели измерительного прибора. Разница между попадающей в фотометр и падающей на лист интенсивностью света, следовательно, никоим образом не представляет собой количество поглощенного листом и еще менее количество погашенного хромофиллом света.

Наиболее близкое к действительности понятие о светопоглощении в тканях и в содержимых в них хлорофиллах

---

[1] О закономерностях диффузного отражения см., например, труды Wright (99), Thaler'a (03).

должно давать исследование организмов одноклеточных или состоящих из одного-двух слоев клеток, или еще исследование микроскопических разрезов через ткани, причем препараты должны быть заключены в воде между двумя стеклянными пластинками: таким образом уменьшается потеря света путем диффузного отражения. Приборы, применимые для качественного или количественного исследования спектров поглощения, — те же, что упомянутые в предыдущих параграфах; те же источники погрешностей. С конкретным обсуждением вопроса о поглощении хромофиллов in situ мы встретимся во второй и третьей частях настоящего труда.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ[1]

Звездочками обозначены труды, известные автору только по рефератам.

СОКРАЩЕННЫЕ ЗНАКИ

Б. Зап. — Ботанические записки при Ботаническом саде СПб. университета
Изв. — Известия Имп. СПб. ботанического сада.
СПб. — Протоколы (Труды) СПб. общества естествоиспытателей.
Харьк. — Труды Общ. испыт. природы при Харьковском университете.
A II. — Annalen der Physik. II Folge (Poggendorf's Annalen).
A III. — Annalen der Physik. III Folge (Wiedemann's Annalen).
A IV. — Annalen der Physik. IV Folge (Drude's Annalen).
A. Ch. — Annales de Chimie et de Physique.
Acta. — Acta Horti Petropolitani.
Ann. — Annales des Sciences Naturelles. Botanique.
Amer. — American Journal of Science.
B. — Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.
Bak. — Centralblatt f. Bakteriologie.
Ber. — Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft.
Berlin. — Monatshefte der Berliner Akademie.
Bihang — Bihang till. K. Svenska Vetenskaps-Akad. Handlingar.
Bioch. — Biochemische Zeitschrift.
Biol. — Compt. rendus de la Societé de Biologie.
Bonn. — Revue générale de Botanique, publ. par. M. G. Bonnier
Buit. — Annales du Jardin Botanique de Buitenzorg.
B. Z. — Botanische Zeitung.
C. — Botanisches Centralblatt.
Ch. Soc. — Journal of the Chemical Society, London.
C. R. — Comptes rendus de l'Acad. des Sciences, Paris.
Crac. — Bulletin intern. de l'Acad. des Sciences de Cracovie.

[1] Этот указатель литературы ко всем трем частям книги перепечатывается полностью. Ред.

Dub. — Du Bois Reymonds Archiv. f. Anat. u. Physiol. Phys. Abt.
Erd. — Erdmann's Journal f. praktische Chemie.
Gen. — Archives des Sciences phys. et natur., Genève.
H. — Hoppe., Seyier's Zeitschrift f. physiologische Chemie.
L. — Liebig's Annalen der Chemie.
Leips. — Sitzungsberichte der Naturforscher-Gesellsch. in Leipzig.
Mel. — Mélanges biolog. Acad. Sci. de St.-Petersb.
Month. — Monthly Microscopical Journal.
O. — Ostwald's Zeitschrift f. physikalische Chemie.
P. — Pringsheim's Jahrbücher f. wissenschaftliche Botanik.
Pflüg. — Pflüger's Archiv. f. gesammte Physiologie.
Phil. — Philosophical Magazine a. Journal of Science.
Ph. R. — The Physical Review.
Quart. — Quarterly Journal of Microscopical Science.
R. S. — Proceedings of the Royal Society, London.
Trans. — Philosophical Transactions of the Royal Society, London
Wien. — Sitzungsberichte der Wiener Akad. d. Wissensch. Math.-naturw. Klasse.
Würzb. — Arbeiten aus dem botanisch. Institut in Würzburg.

Арциховский. 1904, Изв. *4*, 81. Бородин. 1882. СПб. Белоусов. 1906. Харьк. *41*, 26. — 1906, II. Ib. 251.—1906, III Ib. 189. Волков. 1875. Зап. Новор. унив. *17*. Веструмб и Спехов. 1871 *. Тр. Киевск. съезда естеств. Гайдуков. 1899. СПб. *30*, 173.—1903. Б. Зап. *22*. Декенбах. 1893. Б. Зап. *20*, 119.—1895. СПб. *25*,9. Дементьев. 1876. Bull. Soc. Imp. des Natural. de Moscou. Луневский. 1870. Труды физиол. лабор. Варш. унив. I вып. Исаченко. 1904. Изв. *4*, 21.—1906, Ib *6*,20.—1907.Ib. *7*, 59.—1909. Ib. 9, 107. Крашенинников. 1901. Накопление солнечной энергии в растении. Москва. Любименко. 1906. Изв. *5*, 195. Монтеверде. 1890. Б. Зап. *3*,107.—1896. СПб. *27*,131.—1902. Изв. *2*,—1907. Изв. *7*, 37, 47. Монтеверде и Любименко. 1909. Изв. *9*,27. Надсон. 1893. Б. Зап. *4*, вып. I.—1900. Б. Зап. 8,21.—1903. Изв. 3,110.—1903. II. Изв. *3*,96.—1908. Изв. *8*,113.—1908 П. Изв. *8*,122. Палладин. 1892. Харьк. *26*,67.—1897. Прот. засед. Общ. ест. при Варш. унив. 8.—1906. СПб. *37*,143.—1908. Изв. Имп. Акад. наук, стр. 977. Ракузин. 1905. Журн. Русск. физ.-хим. общ. *37*—1906. Ib. 38,790. Сапожников. 1890. Образование углеводов в листьях. —1894. Белки и углеводы зеленых листьев как продукты ассимиляции. Тимирязев. 1871. Спектральный анализ хлорофилла.—1872. Журн. Русск. физ.-хим. общ. *4*,49.—1875. Об усвоении света растением. СПб.—1879. Речи и прот. VI съезда естеств. в СПб., I отд. 58—1888. Публ. лекции и речи. Москва. Цвет. 1899. Изв. СПб. биол. лабор., III вып.—1900. СПб, *30*, вып. I.—1900. II. СПб. *31*, вып. I.—1901. Физико-химическое строение хлорофильного зерна. (Тр. Казанск общ. ест. 35).—1903. Тр. Варш. общ. ест., отд. биол. *14*.

Abbot a. Fowle. 1908. Annals of the Astroph. Observ. of the Smithson. Inst. Washington. 2. Angström. 1854. A II. *93*, 475. Arnaud 1885. C. R. *100*, 751.—1886. C. R. *102*. 1119.—1887. C. R. *104*. 1293. Artari. 1912. Ber. *20*. 201. Askenasy, 1867. B. Z. *25*. 225.—1869. B. Z. *27*, 785.—1875. *33*, 457.

Balsamo. 1892.* Bolletino della Societa dei Naturaliati di Napoli 5.* Batalin. 1872. B. Z. *30*, 393—1874, B. Z. *32*, 433—1879. Acta Horti Petropolitani. *6*, 279. Battera. 1892. * Phycological Memoirs I. Bayley 1878. Ch. Soc. *33*,304. Bayliss. 1906. Biochemical Journ.* I. 175. Becquerel E. 1868. La lumière, ses causes et ses effets. Becquerel, H. 1883. A. Ch. (5) 30. 5. Bellati e Finazzi. 1902*. Atti del Istit. Veneto. 11 II,—514. Bemmelen (van). 1875. Landw. Jahrb. *21*. 135, 161.—1888 Ibid. *35*, 69.—1893. Zeitschr für anorg. Ch. *5*, 466—1897. Ibid. *13*. 233.—1900. Ibid. *23*, 3 21—1904. Ibid. 42, 314. Berthelot. 1872. A. Ch. (4) *26*, 408.—1899. Chimie Végétale et Agricole, Vol. III. Berzelius. 1837. L. *21*, 257.—1837. II. L. *21*, 262.—1838. L. *27*, 296. Billitzer, 1903 0.*45*. 307. Biltz. 1904. Göttinger Nachrichten (Ref. Beibl. z. d. Ann. d. Physik. *29*, 17). Bittner. 1905. Oester. Bot. Zeitschr. *55*, 302. Blackman a. Matthaei. 1905. R. S. *76*, 402. Becat. 1908. Biol. *64*, 101. Bode. 1898. Untersuchungen über d. Chlorophyll. Kassel.—1899. C. 77, 81. Boehm.—1859. Wien. *37*, 453.—1865, Wien, *51*, 405.—1873. Wien. *68*, 171.—1877. Landw. Versuchstat. *20*, 463. Bois-Reymond (du).—1900, Vorlesungen üb. d. Physik d. organisch. Stoffwechsels. Berlin. Borodine. 1882. B. Z. *40*, 608,—1883. Bull. Acad. d. Sc. Petersb. *28*, 328. Bougarel, 1877. Bull. Soc. chim. Paris, *27*, 442. Brand. 1903 Ber. *26a*, 413. Brandt. 1882. Dub. 125.—1883. Mittheil. Zool. Stat. Neapel. *4*, 191. Brdlik. 1908. Wien, *117*, (I), 529. Brennand. 1891. R. S. *49*, 255. Brooks. 1892*. Ueber tägliche und stündliche Assimillation. Halle. Brown a. Escombe. 1905. R. S. (Ser. B.), *76*, 29. Brown a, Morris. 1893. Ch. Soc. 63, 65. Brown a. Wilson. 1905. R, S. (Ser. B.) *76*, 122. Brewster. 1834. Trans. Roy. Soc. Edinburgh, *12*, 538. Bunsen. 1883. A III. *20*, 585.—1885. A III. *24*, 321. Burgerstein. 1900. Bor. *18*, 168. Bütschli. 1890*. U. d. Bau d. Bakterien u. verwandten Organismen. Leipzig. Byk. 1904. H. *49*, 641.

Cazeneuve. 1890. C. R. *110*, 788. Chappuis, 1881. A III *12*, 161. Chautard. 1874 A. Ch. (5) *3*, 1. Chevreul. 1853. C. R. *36*, 981—1866. C. R. *63*, 61. Church. 1878. Chemic. News *38*, 168. Cienkowski. 1871*. Arch. für mikr. Anat. *7*, 379. Claes, 1878. A III. *3*, 389. Claparède. 1861*. Mém. Soc. d. Physique de Genève. 16. Cohn. 1851. Zeitschr. wiss. Zool. *3*, 264.—1867. Arch. für mikr. Anat. *3*, 1. Coppet (de). 1875. A. Ch.

(5). *6*, 275. Correns. 1892. Ber. *10*, 629.—1892. II. Flora *75*. Costerns 1895. Buit. *12*, 73. Cramer. 1862*. Vierteljahresschr. Naturf. Ges. Zürich. 350. Czapek. 1905. Biochemie der Pflanzen I.

Dangeard. 1891.* Le Botaniste. II Ser. 151. Dastre et Floresco. 1899. C. R. *128*, 398. Daubeny. 1836.* Trans. I, 149. Davis. 1907. Ch. Sos. *91*, 1666. Detlefsen. 1888. Würzb. *3*,534. Dippel. 1878. Flora 17. Donath. 1896. A III. *58*, 609. Drude. O. 1873. Die Biologie von Monotropa Hypopytis. Göttingen. Drude, P. 1906. Lehrbuch der Optik. Leipzig.

Ebert. 1888. A III, *33*, 136. Eifving Würzb. *2*, 495. Emich. 1901. Monatshefte d. Chemie. 22, 670. Engelmann. 1880. Pflüg. *23*, 571.—1881. B. Z. *39*. 441. — 1882. B. Z. *40*, 321.—1882. II. Pflüg. *29*, 387.—1882 III. B. Z. *40*. 419,—1882. IV. B. Z. *40*, 663.—1883. Pflüg. 30.—1883, II. B. Z. *41*, 1—1883, III. Pflüg. *32*, 80. 1884. B. Z. *42*, 81.—1887. Bull. Soc. belge de Microscopie, 127.—1887. II. B. Z. *45*, 393.—1888. Pflüg. *42*, 183.—1888. II. Pflüg. *42*. 186—1888. III. B. Z. *46*.—1894. Pflüg. *57*, 375.—1902. Dub. Suppl. 333. Entz. 1876. Biolog. Centralbl. I, 846. Ernst. 1905. Beihefte zum Bot. Centralbl. 19 (1), 118. Etard. 1892. C. R. *114*, 1116.—1894. C. R. *119*, 289.—1895. C. R. *120*, 328. — 1896. C. R. *123*, 824.— 1897. C. R. *124*, 1351.—1898. A. Ch. *13*, 556.—1899. Annales Institut Pasteur. *13*, 456.—1906. La biochimie et les chlorophylles. Paris. Etard et Bouilhac. 1898. C. R. *127*, 119. Euler. 1908. Grundlagen u. Ergebnisse der Pflanzenchemie. I Teil. Euler u. Nordenson. 1908. H. *56*, 223.

Famintzin. 1886. Mel. *6*, 94.—1868. P. *6*, 45—1887. Mém. Acad. des Sc. de St.-Petersb. (7) 36.—1891. Ibid. *38*, № 4.—1872. Biol. Centralbl. 12. Filhol. 1852. A. Ch. (3) *35*, 206.—1854. C. R. *39*, 194.—1860. C. R. *50*, 545.—1868. A. Ch. (4) *14*, 322.—1874. Ç. R. *79*, 612. Fischer u. Schmidmer. 1893. L. *272*, 156. Flahault. 1880. Ann. (6) 9. Frank. 1870.* Die natürliche wagerechte Richtung von Pflanzenteilen. Leipzig. Frankenheim. 1835. Die Lehre von der Cohäsion. Breslau. Fremy. 1860. C. R. *50*. 405.—1865. C. R. *61*, 188.—1877. C. R. *84*, 983. Freundlich. 1906. *0.57*, 385.—1909. Kapillarchemie. Freundlich u. Losew. 1907. *0.59*, 284. Frey. 1898. Zeitschr. f. anal. Chem. *37*, 743. Friedel. 1902. C. R. 135, 1063.—1904. Bonn. *16*, 305. Fürth. 1903. Vergleichende chemische Physiologie d. niederen Tiere. Jena.

Gaidukow. 1900. Ber. *18*, 331.—1902*. Abhandl. d. K. preuss. Akad. d. Wiss.—1903. Ber. *21*, 484.—1903. II, Ber. *21*, 517.—1903. III, Ber. *21*, 535.—1906. Ber. *24*, 1. Gardner. 1844. Phil. *24*,1. Gerland. u. Rauwenhoff. 1871. A II, *143*, 231. Gerland. 1871. A II, *143*, 585. Gibbs. 1892.

Thermodynamische Studien. Leipzig. Giltay. 1898. Buit. *15*, 42. Goppelsroeder. 1889. Ueber Capillaranalyse. Wien.—1901. Verhandl. d. Naturforscherges. in Basel. 14.—1906. Anregung zum Studium der auf Capillar- u. Adsorptionserschein. beruh. Capillaranalyse, Basel. Gore. 1894*. Proceed. Birmingh. Ph. Soc. *19*, 1.—1894. II, Phil. *37*, 306.—1894. III, Phil. *37*, 504. Graham. 1830. A. II, *19*, 139, Greilach. 1904. Wien. *113*, (I), 121. Griffiths. 1905. Chem. News. *91*, 76. Grintzesco. 1903. Bonn. 15. Gris. 1857*. Ann. (4) *7*, 179. Guignet. 1885. S.R. *100*, 434. Guillemain. 1857. Ann. (4) *7*, 154. Gulik. 1907. A. IV, *23*, 277.

Haberlandt. 1876. Wien. *73*, (I), 267 — 1891. Ueb. d. Bau u. d. Bedeutung der Chlorophyllzellen bei Convoluta Roscoffiensis. Leipzig. Hagenbach. 1870. A II, *141*, 245.—1872. A II, *146*, 508.—1874. A II. Jubelband, 303. Hann. 1901. Lehrbuch der Meteorologie. Leipzig. Hansen. 1887. Würzb. *3*, 421.—1888. Würzb. *3*, 289.—1889. Die Farbstoffe des Chlorophylls. Darmstadt. — 1895. Mitt. Zool. Stat. Neapel. II, *255*.—Harsten. 1872. Chem. Centralbl., *523*.—1872. II. AII *146*, 158.—1873. Chem. Centralbl., *204*.—1875 Arch. d. Pharmacie (3) *7*. Haring. 1855. A II, *96*, 543. Hartley. 1891., Ch. Soc. *59*, 106.—1904. Ch. Soc. *85*, 1607. Hausmann. 1909. Bioch. *16*. 294.—1909, II*, P. *46* (4), 599. Hegler. 1901. P. *36*, 229. Herschel, 1842. Trans. 181. Hildt, Marchlewski u. Robel. 1908. Bioch. *10*, 131, Crac., *261*. Hofmeister. 1867. Die Lehre von der Pflanzenzelle. Leipzig. Hope. 1837. Erd. *10*, 269. Hoppe-Seyler. 1879. H. *3*, 339.—1880. H. *4*, 193.—1881. H. *5*, 75. Houstoun. 1906. A. IV, *21*, 535. Humboldt. 1793*. Florae Fridbergensis specimen. Berolini. Husemann. 1861. L. *117*, 202.

Imass. 1899. Ausbreitung wässeriger Lösungen an der Oberfläche fester Körper. Dissert. Heidelberg. Immendorf. 1889. Landw, Jahrb. *18*. 507. Issatchenko. 1903. Bak (II). *10*. Iwanowski. 1907. Ber. *25*, 416,

Jönsson. 1906. Bihang. *28* (III). N. 8. Josopait. 1900. Ueb. d. photosynthet. Assimilationsthät. einig. chlorophyllfreien Chromatoph. Dissert. Basel.

Kayser. 1900—1907. Handbuch der Spektroscopie. 4 Bänder. Klebs. 1883. Arb. a. b. bot. Inst. Tübingen I,—1892*. Zeitschr. wiss. Zool. *55*, 395. Klein. 1889. Ber. *7* (57). Kniep u. Minder. 1909. Zeitschr. f. Bot. 1, 619 Knoblauch. 1901. 0. *39*, 225. Kohl. 1897. Ber. *15*, 111.—1897. II, Ber. *15*. 361.—1898. C. *73*, 417.—1902. Unters. über das Carotin. Leipzig.—1903. Ueber die Organis. u. Physiol. der Cyanophyceenzelle. Jena.—1906. Ber. 24, 124.—1906. II. Ber. *24*, 222.—1906. III, Ber. *24* (39). Konrad. 1872, Flora, *396*. Kötgen. 1894. A III, *53*, 793. Kozniewski u. Marchlewski. 1907. L.

355, 216—1908. Crac., *248*. Kränzlin. 1908. Anatom. u. farbstoff-analyt. Unters. an panachirten Pflanzen. Dissert. Berlin. Kraus C. 1875. Flora, *155*.—1875. II. Flora, 268.—1877. Landw. Versuchst. *20*, 415. Kraus G. 1871. Sitzungsb. phys. med. Soc. Erlangen (B. Z. *30*, 109).—1872. Zur Kenntnis der Chlorophyllfarbstoffe. Stuttgart. Kraus et Millardet, 1868, C. R. *66*, 305. Kroecker. 1892. Ueb. d. Adsorption gelöster Körper durch Kohle. Diss. Berlin. Krukenberg. 1882. Vergleich.-physiol. Studien. *2*, 72. Kühne. 1882. Unt. aus d. physiol. Inst. d. Univ. Heidelberg. *4*, 169. Kundt. 1871. A II, *143*, 259.—1874. A II, Jubelband, 615. Kützing. 1843. Phycologia generalis—1865. Die kieselhaltigen Bacillarieen. Nordhausen.

Lachaud. 1896. C. R. *122*, 1328. Langley. 1884. Researches on the Solar Heat. Washington.—1889. Phil. (5) *27*, 1.—1894. C. R. *119*, 388.—1900. C. R. *13*, 734.—1901. Amer. (4) II, 403. Lankaster. 1873. Quart. *13*, 408.—1876. Quart. *16*, 27.—1886. Quart. *26*, 71. Lagergren. 1893. Bihang. 24 (II) Lagerheim. 1888. Ber. *6*, 73.—1892. Ber. *10*, 364.—1895. Vedenskabs-. Selsk.-Skriften. I. Christiania. Lewis. 1908. Phil. (6) *15*, 499. Ley u. Gorke. 1907. B. *40*, 4473. Linden. 1906. Dub. Supplementband, 1 Lindt. 1885. B. Z. Linebarger. 1896. O. *20*, 131. 1901. Ph. R. *13*, 48. Linhard—1882. Sitzungsb. phys.-med. Soc. Erlangen, *14*, 128. Linsbauer. 1901. Beih. zum Bot. Centralbl. *10*, 53.—1905. Wien. *114* (1), 51, Liro, 1908. Annales Acad. Scient. Fennicae. Ser. A. I. Lloyd. 1885. Chem. News. *51*, 51, Lommel. 1871. A II, *143*, 27.—1871 II, A II, *143*, 483.—1871. III. A II. *143*, 568.—1871, IV, A II, *143*, 656.—1895. A III, *59*, 665. Lopriore. 1904. Ber. *22*, 385. Löw. 1891. C. *48*, 371. Lubarsch. 1879. A III, *6*, 248. Lubimenko. 1905. Bonn. *17*, 381 et C. R. *141*, 535.—1906. C. R. *142*, 1432.—1906 II. C. R. *143*, 609.—1906. III. C. R. *143*, 837.—1907. C. R. *145*, 1347.—1908. Ann. (9), *7*, 322.—1908 II. Bonn. *20*, 162.

Machiati. 1883. Bollet. Soc. entomol. Ital. *15*.—*1886**. Gazzeta chim. Ital. 16—1887. Malpighia—*1*, 478.—1890. Atti Soc. di Natur. Modena (3). 9. Mac Bain. 1907. Ch. Soc. 91. Mac-Munn. 1883. R.S. *35*, 132.—1886. Phil. *176*, 641. Mac Nab. 1873. Landw. Versuchst, *16*, 439. Mann. 1891. Transact. bot. Soc. Edinb. *18*, 394. Maquenne. 1879*. Annales agronom. Marchlewski. 1895. Die Chemie des Chlorophylls, Hamburg.—*1899*. Erd. *59*, 22.—*1899*. II, Erd. *60*, 91.—1899. III, c. *79*, 221. 1900. Erd. *61*, 47.—1900. II. Erd. *61*, 289.—1901. Roskoe-Schorlemmers Lehrb. d. org. Chem.—1902. Erd. *65*, 161.—1903. H. *38*, 196.—1904. H. *41*, 33.—1904. II. Crac., 505.—1904. III. Pflug. *102*, 111.—1905. H. *44*, 422.—1906. B. *24*, 146.—1906 II. Ber. *24*, 534,—1906. III. Ber. *24*. 146.—1906. IV. Przeglad lekarski. *45*, 201.—1907. Bioch. *3*, 287.—1907. II. Bioch. *3*, 320.—1907, III, Ber. *25*, 225.—1907, IV. Bioch. *5*, 344.—1907. V. Bioch. *7*.

282.—1908. B. *41*, 453. 1908. II. *41*, 847.—1908, III. B. *41*, 1858.—1909. Bioch. *16*, 3.—1909. II. Die Chemie der Chlorophylle. Braunschweig. Marchlewski. a. C. A. Schunck. 1900. Ch. Soc. *27*. 1081.—1900. II. Erd. *62*, 247.—1901. Rozprawy Akad. Umiej. Ser. II, *19*, 55. Marchlewski a. Robel. 1907. Crac. 1937. Marchlewski a. Piasecki, 1908. Crac. 127. Martens u. Grünbaum. 1903. A IV. 12, 984. Martini. 1898. Nuovo Cimento (4) *7*. 391.—1900*. Atti del Istit. Veneto. 9.—1904. Ist. Veneto. 63. Maschke. 1872. A II, 431. Masius. 1908*. Ueb. d. Adsorption in Gemischen. Diss. Leipzig. Matthaei. 1904. Trans. (Ser. B). *197*, 47. Mayer. 1893. Amer. (3). 45, 340. Meissner. 1886. A III, *29*, 114. Menze. 1887. Zur Kenntnis d. täglichen. Assimillation. Diss. Halle. Micheli. 1867. Gen. (2) *29*, 5. Michaelis u. Ehrenreich. 1908. Bioch. *10*, 283. Mikosch u. Stöhr. 1880. Wien. *82* (I), 269. Millardet. 1869. C. R. *68*, 462. Milner. 1907. Phil. 13. 96. Mohl. 1845. Vermischte Schriften, 375. Mojoin ef Pelet. 1908. Gen.(4) 25, 64, Molisch. 1899. Oester. Bot. Zeitschr, № 3.—1894. B. Z. 52, I, 177.—1895. B. Z. *53*, I. 131.—1896. Ber. *14*, 16.—1896. II. Ber. *14*, 18.—1901. Wien. *110* I, 354.—1902. Ber. *20*, 442.—1903. Ber. *21*, 23.—1904. Leuchtende Pflanzen. Jena.—1905. B. Z. *63* I, 131.—1905. II. Ergebn. des intern. bot. Kongr. in Wien, *179*.—1905. III. B. Z. *63* II, 369.—1906. Wien. *115* I, 795.—1907. Die Purpurbakterien. Jena. Motagne. 1844. Ann. (3) *2*, 322. Montanari. 1904. Stazione sperim. agrarie. *27*, 909. Monteverde. 1893. Acta. *13*, 123.—1894, Acta. *13*. 201. Müller N. 1869. P. 7, 200.—1872. Botan. Unters. I.—1876. Botan. Unters. 5. Müller-Erzbach. 186. A. III, *28*, 685.—1889. Wien. (IIa) 98. 327.—1902. Wien. III (IIa), 684. Müllermeister. 1907. Zeitschr. f. wiss. Photogr. 5. Mussprat. 1893. Technische Chemie. 4. 1230. Mylius. 1889* Zeitschr. f. Jnstrumentenkunde.

Nägeli. 1849, Gattungen einzelliger Algen. Nägeli u. Schwendener. 1877. Das Mikroskop. Nasse. 1889*. Naturfor. Ges. zu Rostock. (Ref. Zeitschr. wiss. Mikposc. *7*, 350). Nees von Esenbeck. 1834. L. Nebelung. 1878. B. Z. *36*, 369. Nernst. 1894. O. *13*, 531. Nichols. 1893. Ph.R. 1, 1. — 1909, Ph. R. *28*, 122. Nichols a. Merritt. 1904. Ph. R. *19*. 18.—1904 II. Ph. R. *19*, 105. Noll. 1883. Würzb. *3*, 489.

Ostwald. 1900. 0. *32*, 173.—1906. Handb. d. allgem. Chemie, II, Aufl. Ottenberg. 1904. Spektralanalyt. Stud. mit Quarzspektrograph. Diss. Bern.

Palladine. 1891. Ber. *9*, 229.—1897. C. R. *125*, 827.—1902. Ber. *20*, *224*.—1908. Ber. 26a, 125—1908. Ber. 26a, 378. Pantanelli. 1903. P *39*, 167. Parks. 1902. Phil. (6) *4*, 240. 1903. Phil. (6) *5*, 517. Pelet et Grand. 1907. Revue des mat. color. (Août). Pelet et Jess. 1908. Gen. (4) *25*. 64. Pelletier et Caventou. 1818. A. Ch. *9*, 194. Petit. 1878. Bull. Soc.

bot. de France. *25*, 158. Pfaundler. 1860. L, *115*, 37. Pfeffer. 1871. Würzb. I.—1872. B. Z. *40*, 425.—1897. Pflanzenphysiologie I. Pflüger. 1904. A IV, *13*, 890. Phipson. 1879. C. R. *89*, 316.—1879. II. C. R. *89*, 1078. Pierre. 1866. Wien (II), *53*, 339.—1866. II. Wien (II) *53*, 704. Pouillet. 1822. A. Ch. *20*, 141. Prillieux. 1873. C. R. *76*, 1530. Pringsheim., 1875. Berlin, 745.—1875. II. Berlin, 628.—1881. P. *12*, 288.—1882. P. 13, 377.—1886. Berlin, *135*.—1866. II. Ber, *4*, [90].

Quincke. 1870. A II. 139, 1,—1877. A III, 2,145.—1902. A IV,—7, 631,

Rayleigh. 1871. Phil. 41, 114.—1899. Phil. (5) 47. 375. Reinke. 1873, F ora, 145.—1876, P. 10, 399.—1882. H. 6, 263.—1883. Ber. I, 395.—1883. II B. Z. 41, 65.—1884. Ber. 2, 265.—1884. II. B. Z. 42. 1.—1885. B. Z. 43, 65.—1885. II. Ber. 3, 376.—1886. B. Z. 44, 166.—1886, II. Ber. 4, CXIX.—1887. B. Z. 45, 271.—1893. Sitzungsb. d. K. Preuss. Akad. 30, 527.—Richardson a. Fortey. 1896. Ch. Soc. 69. 1352. Richter A. 1902. Bonn. '14, 150. Richter P. 1880. C. I, 605. Rohland. 1907. Zeitschr. f. anorg. Ch. 56, 46. Rosanoff. 1868. Mem. Soc. imp. Sc. nat. Cherbourg. 13, 145. Rubens. 1905, A IV, 18, 725. Runge. 1897, Zeitschr. f. Mathem. u. Phys. 42, 205. Russell. a. Lapraik. 1882. Ch. Soc. 41, 334.

Sachs. 1859. Lotos, 6.—1862. Flora. 133.—1864, B. Z. *22*, 353.—1864 II. Flora, 497.—1884. Würzb. 3, 1. Sachsse. 1875. Leipz. 115.—1876. Ibid. 36.—1876 II. Ibid. 39.—1876. III. Ibid., 72.—1877. Die Chemie u. Physiologie der Farbstoffe. Leipzig.—1880. Phytochem. Untersuchungen. I.—1881. Leipz. 7.—1883, Ibid., 97.—1884. Chem. Centrbl., 115.—1888. Lehrb. d. Agrikulturchemie. Salm-Horstmar. 1854. A II, 93, 159. Sauvageau, 1908. Biol. 64, 95.—1908 II. Ibid. 97.—1908. III, Ibid., 103. Schimper. 1885. P. 16, 1. Schmidt. 1894. 0.15, 56, Schönbein. 1861. Verhandl. d. Naturf.-Ges. Basel. III Teil, 249. Schönn. 1870. Zeitschr. analyt. Ch. 9, 327.—1872 A II. 145, 161. Schrötter. v. Kristelli. 1895. C. 61, 33. Schunck E. 1885. R. S. 39, 348.—1886. R. S. 42, 184.—1888. R. S. *44*, 448.—1891. R. S. 50, 302.—1894. R. S. *55*, 351.—1901. R. S. 69. Schunck E. a. Marchlewski, 1891. R. S. *59*, 233.—1894. L. 278, 329.—1895. L. 284, 81.—1895 II. L. 288. 209—1896. L. 290, 306.—1896, II. B. 29. 1347. Schunck C. A. 1898. R. S. 63, 389.—1899. R. S. 65, 177.—1901. R. S. 68, 474.—1903. R. S. 72, 165. Schütt. 1887. Ber. 5. 259.—1888. Ber. 6, 36.—1888. II. Ber. 6. 305.—1890. Ber. 8, 9.—1896. Engler-Prantls natürl. Pflanzemilien. I T. 1 Abt. b. Senebier. 1782. Mémoires physico-chimiques. Sieben. 1879. A III. 8. 137. Siebold. 1847. * Zeitschr. wiss. Zool. 1, 274. Simmler. 1862. A II. 115, 599. Smith. 1869. Amer. 48, 83. Sorby. 1867. R. S. 15, 433.—1870. Month. 3, 229.—1871.

Month. 6, 120.—1871. II. Quart. II, 215.—1871. III. Quart. (2) 1, 61.—1873. R. S. 21, 442.—1875. Month. 13, 198.—1875. II. Month. 13, 161.—1875 III. Quart (2) 15. 47.—1875 IV. Quart. (2) 15. 166.—1876. Journ. of Botany, brit. a. foreign. 14; 16.—1877. Journ. Linnean Soc. 15, 34. Staats. 1895. B. 28, 2807. Stackelberg. 1896. 0. 20, 337. Stahl, 1906. Naturw. Wochenschr. 21. 289.—1907. Ber. 25, 530.—1909. Zur Biologie des Chlorophylls. Jena. Stenger. 1886. A III, 28. 201.—1887. B. Z. 45. 120.—1888. A III. 33. 577. Schwalbe. 1905. A III, 16, 32. Stark. 1907. Physik. Zeitschr. 8, 81—1907 II. Ibid., 248. Stokes. 1852. Trans. I, 463.—1864. R. S. 13. 144. Stoklasa. 1896. B. 29. 2761. Stoklasa, Brdlik u. Just. 1908. Ber. 26a. 69. Stoklasa, Brdlik u. Ernest. 1909. Ber. 27. 10. Studnicka. 1861. Wien. 44 (II). 289. Sutherland. 1902. Phil. (6). 4, 625.

Tammes. 1900. Flora, 204. Thaler. 1903. A, IV, *11*. 996. Thoday. 1909. R. S. (B) *82*, 1. Thomson. 1889. Applications of Dynamics to Physics, p. 191. Tieghem (Van), 1880. Bull. Soc. bot. de France *27*, 174. Thompson a. Pendergast. 1896.* Minnes. Bot. Stat. *9*, 575. Timiriazef. 1877. A. Ch. (5) *12*, 355.—1885. C. R. *100*, 851.—1885. II. Ann. (7) *2*, 99.—1886. C. R. *102*, 686.—1890. C. R. 110, 1895. C. R. *120*, 467.—1903. K. S. *72*, 424. Tschirsch. 1884. Unters. üb. das Chlorophyll. Berlin.—1884. II. A III, *21*. 370.—1887. Ber. *5*, 128.—1896. Ber. *14*, 71.—1896. II. B, 29, 1766.—1904. Ber. 22, 414. Tswett. 1896. Gen. (4) *2*.—1900. C. *81*,—1900. II. Bull. Soc. chim. Paris (3) *23*, 309.—1900. III. C. R. *131*, 842.—1901. C. R. *132*, 149.—1901, II. 0.*36*. 450.—1905. B. Z. *63* (II), 273.—1906, Ber. *24*, 234.—1906. III. Ber. *24*. 235.—1906. III. Ber. *24*, 316—1906. IV. Ber. *24*, 384.—1907. Ber, *25*, 71.—1907. II. Ber. *25*, 137.—1907. III. Bioch. *5*, 6.—1907 IV. Ber, *25*, 388.—1907. V. Bioch. *6*, 373. 1908. Ber. *26*a, 88.—1908. II. Ber. 26a. 94.—1908 III Ber. *26*a, 214.—1908. IV. B. *41*, 1352.—1908. V. Bioch. *10*, 404.—1908, IV. Bioch. *10* 414.—1908, VII, Bioch. *10*, 426.—1908. VIII, Bonn. *20*, 328. Tufts. 1907, Ph. R. *25*, 433.

Vaubel. 1906. Erd. *74*, 232. Vierordt. 1873. Die Anwendung des Spektralapparates zur Photometrie, etc. Tübingen. Villard. 1907, Etude de physiologie comparée sur le pigment chlorophyllien, etc. Lyon. Vogel. 1878, B. II, 1363.

Walden. 1906. O. *55*, 683. Walker a. Appleyard. 1896, Ch. Soc. *69*. 1331. Warburg u. Ihmori. 1886. A III. *27*, 481. Warming, 1876*. Om nogle ved Danemarks Kysten levende Bakterien. Kjöbenhavn. Wegscheider. 1884. Ber. *2*, 494. Wick. 1907 Ph. R. *24*, 356. Wiedemann. 1888. A III. *34*. 446. Wiesner. 1872 P. 8, 575.—1874. Wien. *69*, 1, 327.—1874. II. Flora, 278.—1874. III. A II. *153*, 496.—1874. IV A II. *153*, 622.—1874. V

Flora *67,* 73.—1879. Die natürl. Einricht. z. Schutze d. Chloroph. in d. lebend. Pfl. Wien.—1877. Oest. bot. Zeitschr. *27* 7.—1877. II. Die Entstehung d. Chlor in der Pflanze. Wien.—1904. Ber. *22,* 64, 316. 1904 II. Wien. *113* I, 469.—1905. Ber. *23,* 49.—1907. Der Lichtgenuss d. Pflanzen, Leipzig. Winkelmann. 1903. Handb. d. Physik. IV.—1906. Handb. d. Ph. Optik. Wille. 1895. Biol. Centrbl. *15,* 529. Wildenow. 1802. Grundriss d. Kräuterkunde, Berlin. Willstätter. 1906. Chemiker Zeit. *30,* № 78.—1906. II. L. *350,* 48.—1907. Verh. der 78 n. Versamml. Deustsch. Naturf. u. Aerzte. II, 123. W. u. Mieg 1906. L. *350,* 1.—1907. L. *355,* I.—W. u. Hocheder. 1907. L. *354,* 205. W. u. Pfannenstiel. 1908 L. *358,* 205. W. u. Benz. 1908. L. *358,* 266. Winogradsky. 1888. Beiträge z. Morphol. u. Physiol. d. Bakterien, Heft 1, Witt. 1990. Färber-Zeitung. Heft 1. Woods. 1899. Bakt. (II) *5,* 745. Woronine. 1880. B. Z. *38,* 625. Wright. 1899. Photom. Mess. diffus. reflektier. Substanzen. Diss. München

Zeise. 1847. L. 62, 380. Zenghelis. 1904. 0. *50,* 219.—1906. 0. *57,* 89. Zopf. 1889. Zeitschr. f. wissensch. Mikrosc. *6,* 172.—1891—1893. Beitr. z. Phys. u. Morph. nied. Organismen.—1895. Biol. Centrbl. *15,* 417.

ТАБЛИЦЫ

ОБЪЯСНЕНИЕ ТАБЛИЦ[1]

Таблица I. 1 — приборы для хроматографического анализа (стр. 144); 2 и 3 — части прибора, 4 — сосуд для отмывания алкоголя из петролейно-эфирных экстрактов хлорофилла (стр. 147); 5 — оптическое сечение резервуара манометра *M* в рис. 1.

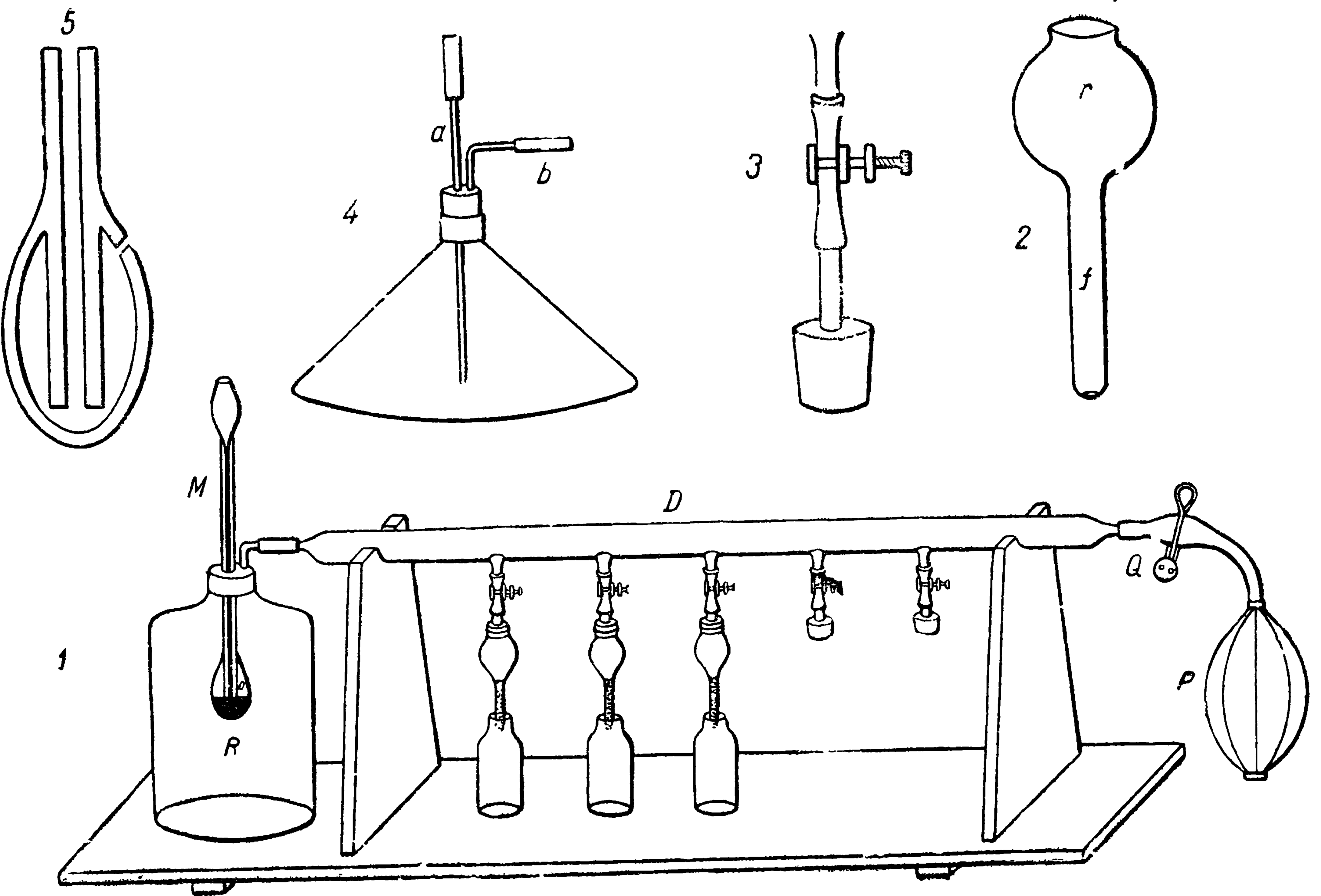
Таблица II. 1 — прибор для хроматографического разделения пигментов (стр. 145); 2 — хроматограмма (схематизированная) нормального хлорофилла;[2] 3 — хроматограмма измененного кислотой хлорофилла;[2] 4 — вертикальное оптическое сечение прибора для спектроскопических исследований (стр. 186); 5 — горизонтальная проекция того же прибора.

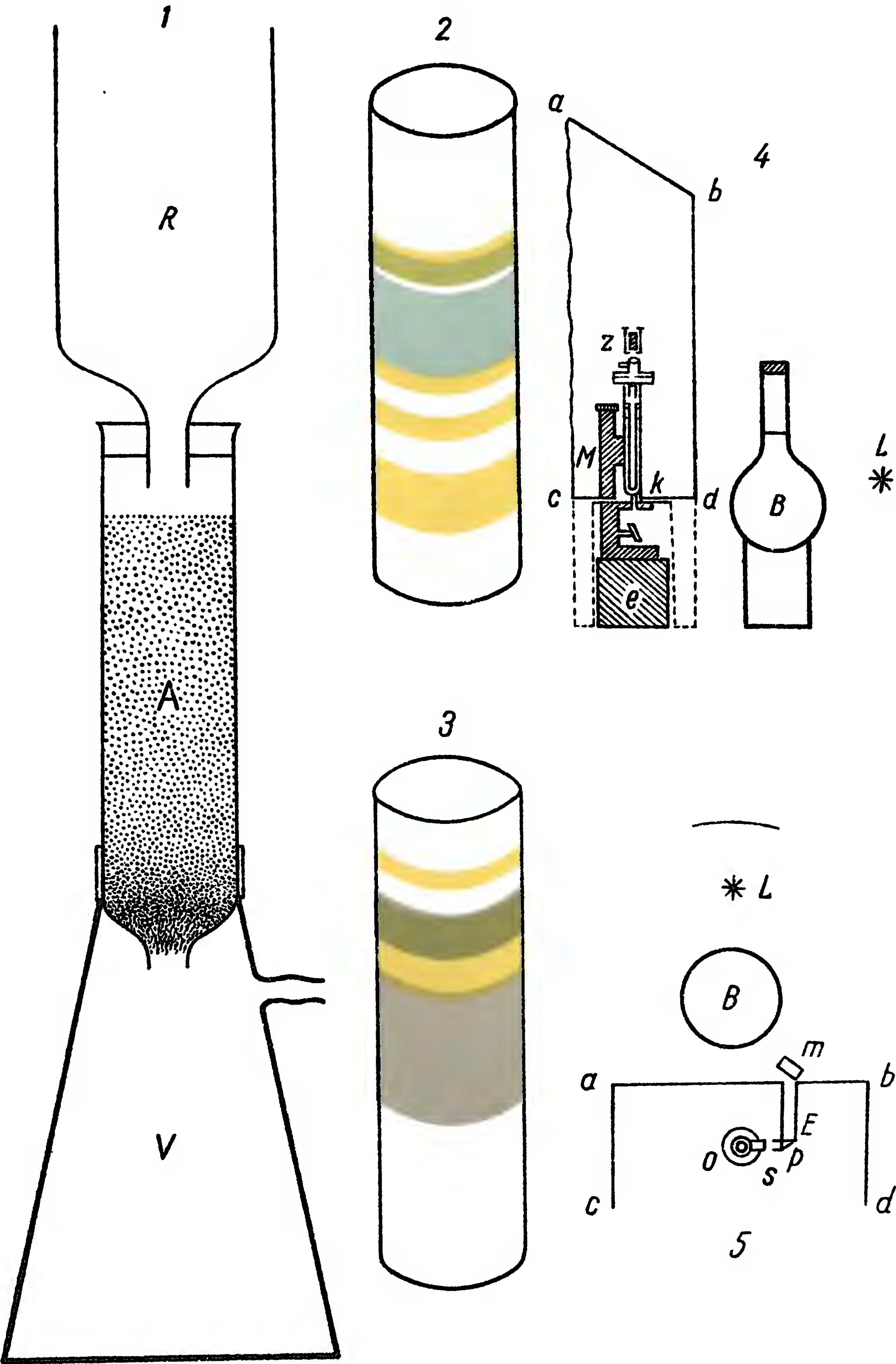
---

[1] Объяснения к таблицам III — V, относящимся ко II части, не воспроизводятся нами, как и сами таблицы. — Ред.

[2] Относится ко II части. — Ред.

ТАБЛИЦА I




1
R
A
V
2
3
4
a
b
c
d
z
M
k
e
B
L
5
m
E
o
s
p

ПРИЛОЖЕНИЯ



Академик А. А. РИХТЕР
и профессор Т. А. КРАСНОСЕЛЬСКАЯ

РОЛЬ М. С. ЦВЕТА В СОЗДАНИИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АДСОРБЦИОННОГО АНАЛИЗА

Если хотя бы кратко охарактеризовать состояние наших знаний о хлорофилле в те времена, лет за 50 до нашего времени, когда Михаил Семенович Цвет впервые познакомился в университете с этой важной главой физиологии растений, в которую он впоследствии внес такой значительный вклад, то не трудно согласиться с самим Цветом, что вопрос о структуре хлорофильных зерен „еще далеко нельзя было считать законченным". Пигмент же зеленых частей растения — хлорофилл — описывался отчасти примитивно, отчасти неверно. В одном из лучших в те времена курсов по физиологии растений В. И. Палладина (1891) мы читаем: „Хлорофилл — это азотистое тело, нерастворимое в воде, растворимое в спирте, эфире и маслах. Легко разлагается от действия света и кислот. Зола спиртовой вытяжки хлорофилла содержит железо". Дальше следует описание методов исследования хлорофилла. Сложная химическая обработка такими сильно действующими веществами, как баритовая

вода, едкое кали, уксусная кислота, обнаруживала наличие в спиртовой вытяжке, полученной из зеленого листа, одного зеленого и, по крайней мере, одного желтого пигмента. Это разделение пигментов рекомендовалось проводить или методом Крауса, согласно которому зеленый пигмент переходит в отстаивающийся верхний бензинный слой, а желтый сосредоточивается в нижнем спиртовом слое, или же по способу Ганзена, по которому спиртовая вытяжка хлорофилла, полученная из растительного зеленого материала, подвергается такому сильному методу обработки, как нагревание с едким кали в течение 3 часов на водяной бане до кипения. Понятно, что в результате подобных воздействий в руках исследователей оказывались не естественные пигменты, а артефакты, которые только в слабой степени отражали собою истинное строение хлорофилла.

Такое положение дела в этом вопросе произвело на М. С. Цвета сильное впечатление, и мысль его рано начала работать в направлении отыскания аналитических приемов без применения сильных химических воздействий, в отыскании физических приемов для получения пигментов в чистом виде.

Научная деятельность М. С. Цвета распадается на три периода: женевский (1891—1896), петербургский (1897—1901) и варшавский (1901—1915). В начале империалистической войны, в 1915 г., М. С. вынужден был вместе с Варшавским политехническим институтом переехать в Нижний Новгород. В последние годы своей жизни он ничего не публиковал.

В эти разные периоды своей деятельности Цвет работал не только в разных городах, но и над весьма разными вопросами в каждый период. Все работы Цвета относятся к следующим вопросам: несколько работ анатомического и микрохимического характера (см. в списке его работ №№ 1, 2, 9, 12, 26, 36, 54 и 57), три работы о новых прибо-

рах (3, 22 и 29), две работы по клеточной физиологии (4 и она же 5, 6 и 7 и 11) и остальные работы по хлорофиллу и другим пигментам клетки — из них по антоциану три (60, 61 и 62) и по вопросам фотосинтеза.

Начал свою деятельность Цвет в Женеве с анатомических работ. Первая из них относится к ненормальностям строения стебля пасленового растения лиция (*Lycium*). Он начал ее еще студентом III курса под влиянием проф. Тюри (Thury); в 1893 г. был собран первый для нее материал, в 1894 г. (I) он опубликовал часть исследования; затем он продолжал ее, был за нее премирован Женевским университетом (Prix Dary), полностью ее не напечатал, а в 1899 г., находясь уже в Петербурге, опубликовал только частично (12). Значительно позднее, в Варшаве (в 1907 г.). Цвет публикует еще одну анатомическую работу (36) из совершенно другой области, именно о водяных устьицах (гидатодах) лобелиевых. К числу анатомических работ относятся и две публикации, представляющие собою критические статьи (9 и 57). Первая из них написана в Петербурге (1899), вторая в Варшаве (1911).

В Женеве Цвет публикует маленькую заметку с описанием прибора для определения транспирации (3, 1896), но в основном он занят своей диссертацией на степень доктора естественных наук Женевского университета по вопросам клеточной физиологии. На ход этой работы, кроме проф. Тюри, которому он ее посвящает, большое влияние имел проф. Шода (Chodat). О нем Цвет и впоследствии говорит, как о своем учителе. В этой работе, относящейся к клеточной физиологии, центральную часть занимает глава о хлоропластах. Именно эта часть работы послужила М. С. исходной для его дальнейших работ, она стала связующим звеном между его женевскими исследованиями и работами последующих периодов. К клеточной физиологии из более поздних работ (1899) относится работа II.

После переезда в 1897 г. в Петербург и обоснования там в Биологической лаборатории М. С. сразу берется за изучение хлорофилла. Он выступает со своей первой русской статьей, носящей „программный“ характер: „Гемоглобин и хлорофилл. В каком направлении желательно изучение последнего тела“. И хотя в отчете Биологической лаборатории за этот год сказано, что: „Михаил Семенович Цвет занимался изучением вопроса о значении гемоглобина и хлорофилла и вообще анатомией и физиологией растений“, особенно его занимал хлорофилл.

В 1899 г. Цвет публикует почти одновременно по-русски и по-французски работу (10 и 13) „О новом физико-химическом свойстве протеиновых веществ“ и ее же в 1900 г. (18) в журнале Парижского химического общества (перевод работы 10). В том же 1899 г. появляются два предварительных сообщения (14 и 15); в 1900 г. перевод последнего на немецкий язык (16) — к сообщению 1900 (17) о хлороглобине, сложном веществе, в котором объединены, согласно Цвету, коллоидальный гипохлорин и пигменты зеленой пластиды. В апреле 1900 г. Цвет делает в СПб. обществе естествоиспытателей, в Отделении ботаники, доклад под заглавием: „О природе хлороглобина“, где в прениях приняли участие И. П. Бородин, Н. М. Гайдуков и В. Л. Комаров. Затем появляется французская работа (19, 1900) „О синем хлорофилле“ и тогда же по-русски (20) „Хлорофиллины и метахлорофиллины“. В этих работах, вразрез с широко тогда распространенным мнением и в сущности единственным, принимавшимся в науке,—о существовании одного зеленого и одного желтого пигмента в зеленой пластиде, Цвет доказывает существование двух зеленых пигментов, двух хлорофиллов, или, как он предложил именовать их, „хлорофиллинов“ (хлорофиллин альфа и хлорофиллин бета). Попутно он доказывает, что так называемый „кристаллический“ хлорофилл („бородинские кристаллы“ Монтеверде) является

артефактом и в растении не существует. Он приходит к заключению о необходимости подвергнуть полной переработке весь вопрос о химии хлорофилла. Мы приведем характерную выдержку из этой работы, так как в ней Цвет впервые высказывает идею о значении адсорбции в изучаемых им явлениях:

„Хлорофиллины не извлекаются из листьев чистым бензином не потому, что они были бы в нем нерастворимы, а потому, что они удерживаются в хлоропластах молекулярными силами. Точно таким же образом удерживаются и хлорофилл (ксантофилл Крауса, Монтеверде и др.) и гипохлорин. Каротин же легко выщелачивается. Но достаточно прибавить к бензину одну сотую спирта, чтобы молекулярные силы были преодолены, и все пигменты переходят в раствор, равно как и гипохлорин.

Правильность такого объяснения действия примеси следов спирта к бензину доказывается следующими, весьма изящными опытами. Растертая ткань обрабатывается на холоду 40% спиртом, после чего высушивается при той же обыкновенной температуре. Если бы спирт действовал химически на пигменты и гипохлорин, превращая их из нерастворимых в растворимые в бензине, то ткань, обработанная спиртом, должна была бы после удаления последнего обесцвечиваться в бензине. Между тем после вышеуказанной манипуляции листья отдают бензину только каротин, точь-в-точь как в свежем или прямо высушенном виде.

С другой стороны, гипохлорин и пигменты, внедренные в фильтровальную бумагу, полотно или крахмал, относятся к бензину точь-в-точь, как они это делают в хлоропласте. Внедренные же в песок или в свободном виде, они растворяются в бензине. Следовательно, действие спирта не химическое, а физическое, в своем роде каталитическое. Молекулярные силы, удерживающие компоненты хлороглобина (за исключением каротина) в хлоропластах или бумаге, должны быть отнесены к категории адсорбционных“ (20, стр. 284).

На ту же тему в 1901 г. появилось краткое сообщение (21), а затем и книга (23), послужившая Цвету магистерской диссертацией: „Физико-химическое строение хлорофильного зерна". Книгу эту Цвет посвящает памяти своего отца, Семена Николаевича, „мыслителя и деятеля". К сожалению, это единственное упоминание об его отце, которое до нас дошло. Работать над этим сочинением Цвет начал еще в Биологической лаборатории, но продолжал и закончил его в Физиологической лаборатории Академии Наук, где он встретил радушное гостеприимство академика А. С. Фаминцына, щедро предоставившего ему средства Лаборатории. Из изложенного мы видим, как тесно это произведение связано с предыдущими работами Цвета, но это исследование связано также и с его последующими работами. Сам Цвет считал, что в этой книге мы находим „зачатки" адсорбционного метода. Его он развил впоследствии в тех работах, которые поставили М. С. Цвета в ряды первоклассных мировых ученых. В этой книге, наряду с другими, вновь выдвигается и обосновывается идея о возможности на основании адсорбционных связей выделить из сложных растворов отдельные вещества. Мы находим во II отделе этой работы параграф (стр. 86), озаглавленный: „Адсорбционная связь пигментов с остовом хлоропласта и вытекающие из нее условия экстрагирования". Приведем выдержки из этой части работы:

„Перехожу теперь к изложению опытов, поставленных мною для разрешения занимающего нас вопроса.

Свежие листья, если они не слишком сочны, можно превосходно извлекать бензином или лигроином, стоит только предварительно тщательно растереть их и затем продолжать растирание под слоем растворителя.

Последний окрашивается в желтый цвет и, таким образом, можно удалить почти начисто одно из желтых ближайших начал хлорофилла (каротин, по исследованиям Арно)

Желтый раствор содержит лишь самые незначительные следы хлорофиллинов.

Такой же результат получается и при обработке бензином или лигроином сухих листьев (высушенных при низкой температуре и, если нужно, нейтрализованных).

Следовательно, если хлорофилл из листьев не растворяется в бензине, то причина этого не в том, что растворитель не проникает в хлоропласты, ибо мы видим, что один из пигментов хлорофилла растворяется.

Теперь мы встречаемся с замечательным явлением. Стоит прибавить к бензину небольшую долю спирта (1/100 например), чтобы вызвать растворение остальных пигментов хлорофилла и гипохлорина, который обнаруживается в сухом остатке вытяжки помощью резорцинового реактива.

Бензин или лигроин с прибавлением 1/20 — 1/10 алкоголя чрезвычайно быстро обесцвечивают размельченные ткани и могут считаться нормальными растворителями хлорофилла.

Является вопрос: в чем состоит это замечательное влияние спирта?

Зависит ли оно от химического действия алкоголя, превращающего гипохлорин и некоторые пигменты из нерастворимых в бензине в растворимые? Для проверки этой гипотезы я поставил следующие опыты.

Из двух порций растертых листьев одна растирается, кроме того, с 40-процентным спиртом, и потом обе порции высушиваются при 45°. Затем сухой материал обрабатывается лигроином. Обе порции окрашивают растворитель в желтый цвет. После прибавления минимальных количеств спирта жидкость окрашивается в зеленый цвет; весь хлорофилл растворяется.

Свежие листья, растертые с прибавлением 40-процентного спирта и затем немедленно обработанные лигроином, быстро обесцвечиваются.

Из этих опытов очевидно, что спирт во всяком случае химически не изменяет хлорофильных пигментов. Он действует своим присутствием. Тут можно сделать два предположения:

1) Хлорофиллины и их спутники (см. следующую главу) нерастворимы в чистом бензине или лигроине; они могут растворяться в этих жидкостях только благодаря примеси алкоголя.

2) Хлорофиллины и их спутники растворимы в чистом бензине или лигроине, но они находятся связанными с остовом хлоропласта посредством молекулярных сил адсорбционным образом, и спирт необходим только для преодоления этих молекулярных сил.

Если первое предположение верно, то хлорофилл, извлеченный спиртом и затем высушенный, не должен растворяться в бензине. На самом же деле остаток вытяжки хлорофилла, выпаренный в стеклянной чашке, целиком растворяется в петролейных углеводородах.

Остается, следовательно, только второе предположение, относительно адсорбционного сродства гипохлорина и некоторых пигментов хлорофилла к остову хлоропласта. Оно блистательно подтверждается следующим, чрезвычайно изящным опытом. Приготовляется хлорофильная вытяжка в петролейном эфире (с прибавлением спирта). Зеленый раствор наливается в колбочку в количестве 10—20 куб. см, и туда же кладутся несколько комочков шведской бумаги. Колбочка соединяется с водяным насосом, и жидкость испаряется досуха, причем хлорофилл и сопутствующие ему вещества внедряются в бумагу.

Такая искусственная хлорофиллоносная ткань является совершенно подобной свежему или сухому листу в своем отношении к растворителям. Бензин или лигроин извлекают из нее только каротин. Бумага, положенная в бензин, остается по истечении суток изумрудно-зеленой, между тем

как окружающая жидкость окрашена в чисто желтый цвет и содержит только спектроскопические следы хлорофиллинов. Но стоит прибавить к бензину каплю спирта, и бумага немедленно обесцвечивается, отдавая растворителю хлорофиллины, ксантофилл (хризофилл...) и гипохлорин.[1]

Таким образом окончательно опровергается уже сама по себе мало вероятная теория Карла Крауса и Монтеверде, принимавшая, что „хлорофилл" химически изменяется спиртом, и доказывающая, что компоненты хлороглобина (за исключением каротина) не растворяются из листьев в петролейных углеводородах не потому, что они в них нерастворимы, а вследствие того, что их удерживают в остове хлоропласта молекулярные, адсорбционные силы.[2]

В данном случае, впрочем как и во всех случаях адсорбции, действующие молекулярные силы находятся в некоторой зависимости от химической природы веществ, но называть их химическими было бы весьма неуместно.

Здесь следует упомянуть об одном интересном явлении на которое, если не ошибаюсь, никто еще не указывал и которое находит свое объяснение в предыдущем: между тем как свежие или высушенные при обыкновенной температуре листья отдают петролейным углеводородам только каротин, листья, прокипяченные в воде, окрашивают бензин в зеленый цвет, отдавая ему часть своих хлорофиллинов. Но мы знаем, что при кипячении в воде хлороглобин частью выступает из хлоропластов в виде мелких капелек, выходя, таким образом, из сферы действия адсорбционных сил. Следовательно, действие кипячения в воде на извлекаемость хлорофилла листьев бензином или лигроином становится вполне понятным.

---

[1] Вместо бумаги можно употреблять полотно или крахмальный порошок.

[2] Относительно явлений адсорбции см. Lehmann I и Ostwald I и II (S. 338—339).

На основании всего предыдущего мы должны представить себе, что хлороглобин не находится в хлорофильном зерне в виде отдельных крупинок, в виде доступных микроскопическому наблюдению зернышек, но что он состоит в самой тесной, молекулярной связи с остовом хлоропласта, причем компоненты хлороглобина, образующие соединение вроде раствора, кроме того независимо один от другого связаны адсорбционным образом с веществом остова[1].

Почему адсорбционная связь каротина преодолевается чистыми петролейными углеводородами, между тем как для освобождения остальных пигментов и гипохлорина требуется еще присутствие спирта — вопрос пока не разрешенный, но особенность химической природы каротина, представляющего из себя углеводород, делает понятным такое различие в свойствах" („Физико-химическое строение хлорофильного зерна". 1901, стр. 88 и далее).

То, что Цвет назвал свой метод хроматографическим, может вызвать некоторые недоразумения. Метод этот в настоящее время широко применяется к самым разнообразным веществам и, очень часто, к неокрашенным. Ограничивал ли сам Цвет возможность применения его к пигментам? Оказывается, нет. Цвет неоднократно и настойчиво, а не вскользь говорил о применимости его и к неокрашенным веществам, хотя сам он работал только с пигментами. Мы находим эти указания и в работах, которые мы переиздаем (47, стр. 84, см. настоящее издание, стр. 138), есть эти высказывания и в других его публикациях. Так, например, еще в 1907 г. (33, стр. 7), говоря о поглощении окрашенных веществ различными адсорбентами, он, после слов „окрашенные вещества", в скобках ставит „или бесцветные веще-

[1] Независимость компонентов с точки зрения адсорбции доказана собственно только для каротина, но она, вероятно, имеет место и для других компонентов хлороглобина.

ства". В работе 1914 г. (61) „Об искусственном антоциане" он говорит: „Все цветное естественно привлекает наше внимание, и естественна же склонность наша усматривать в определенной окраске веществ особую преднамеренную целесообразность. Отсюда и возникают порою лжепроблемы. Ведь нет основания приписывать какому-либо веществу особые физиологические или ойкологические свойства только потому, что вещество это для глаза человеческого является окрашенным. С точки зрения объективной, все вещества „окрашены": белок, сахар и вода так же, как антоциан или хлорофилл; только главные поглощения лучистой энергии падают на другие спектральные участки. Целесообразна ли эта, всегда имеющаяся окраска, т. е. необходима или вообще полезна ли она для поддержания жизни данного существа, это должно быть установлено эмпирическим путем для каждого отдельного случая. Сама по себе субъективная окраска не имеет ровно никакого значения".

В изложении своих работ М. С. Цвет отличался краткостью. Из 62 его работ лишь две представляют собою большие книги в 268 и 379 стр. (23 и 47), одна (4) — небольшая книжка в 83 стр., остальное — статьи, большая часть которых занимает от 1 до 5 страниц, а статей в 10 страниц и больших всего 5. Написаны работы Цвета ясным и нередко красочным, эмоциональным стилем. Таковы заглавия некоторых его работ: „Существует ли зеленое вещество называемое хлорофиллом?", „Снова о филлоксантине" (38), „Так называемый «кристаллический» хлорофилл — смесь" (48) В одной работе по поводу неправильного толкования Шода и Бубье наблюдений Цвета он говорит: „Ну и пускай" (Mais il n'importe) (11). В магистерской диссертации (23) во введении он восклицает: „Не ведаю!" („Ignoramus"); в другой статье, не соглашаясь с прежними авторами в вопросе о происхождении красного пигмента хвои туи, он говорит: „И вовсе не так" (Il n'en est rien) (51). Одну статью он за-

канчивает сентенцией: „Такова в основных чертах моя гипотеза. Соответствует ли она действительности? Пусть скажет об этом опыт“ (A l'expérience de prononcer) (59).

Весьма интересно вспомнить, как в свое время были приняты работы Цвета, и сопоставить с тем, как они были расценены в дальнейшем.

Краковский химик Мархлевский был, пожалуй, единственным, кто отрицательно отнесся к работам Цвета по пигментам (1907), а в связи с этим и к его адсорбционному методу. Объяснение этому приходится видеть в том, что Цвет полемизировал с Мархлевским, в то время видным специалистом по пигментам листа, и у них возникли научные разногласия. К этому нужно еще прибавить, что Цвет обвинил Мархлевского в замалчивании работ Сорби (Sorby) и, понятно, восстановил Мархлевского против себя. Цвет озаглавил одну из своих работ „К истории исследований хлорофилла“ (34), Мархлевский парирует статьей под заглавием „Об исторических исследованиях г. Цвета над хлорофиллом и о его хлорофиллинах“. „Исторические“ нужно понимать иронически, потому что в статье говорится: „Г. Цвет позволяет себе делать выводы об этом, не зная, что абсолютно невозможно, пользуясь его примитивной методикой, точно изучать спектры хлорофилла в более преломляемой части спектра“.

Значительные разногласия были у Цвета и с Монтеверде, и они отражены в полемических статьях (17). Нельзя отрицать и того, что иногда исследования Цвета встречали своего рода „молчаливое недоверие“, как выразился Цехмейстер в исторической части своей книги, и что ряд высказываний Цвета был недооценен, а затем и забыт. Это относится, например, к указаниям на возможность применения адсорбционного метода к бесцветным веществам, то же и в отношении опытов с возможностью анализа таких веществ, как различные краски (судан III, судан IV, цианин), лютеин и

„лецитин“ яичного желтка. И это несмотря на то, что Цвет даже в заглавии своей книги (47) подчеркивает: „Хромофиллы в растительном и животном мире“. Справедливо это и в отношении его высказываний о сложности каротина и в отношении идеи о возможности количественных определений адсорбционным методом. Несмотря на все сказанное, было бы неправильно утверждать, что работы Цвета вообще не были оценены его современниками. Достаточно вспомнить что уже вскоре по приезде М. С. Цвета в Петербург в 1898—1899 гг., академик А. С. Фаминцын предоставил ему рабочее место в своей лаборатории, а такие высокоавторитетные ученые, как И. П. Бородин, М. С. Воронин и Д. И. Ивановский, проводят его (в 1900 г.) в члены СПб. общества естествоиспытателей. Популярная пресса также отметила работы Цвета и в журнале „Естествознание и география“ за 1901 г., где мы находим реферат его работы (20). В 1911 г. Академия Наук присуждает Цвету за его книгу „Хромофиллы в растительном и животном мире“ Большую премию А. Н. Ахматова.

И все-таки нужно признать, что при жизни Цвета идеи его и метод особого применения вне его личной лаборатории не имели. Только Дэрэ (Dhéré) с 1911 г. пользуется в своей лаборатории методом Цвета, в 1912 г. появляется статья Графе (V. Grafe) в „Handbuch d. biochemisch. Arbeitsmethoden“ с подробным описанием хроматографического метода, но широкое распространение адсорбционный метод приобрел только после классических работ Вильштеттера по энзимам (1928). Начиная с 1931 г. метод этот находит применение в самых разнообразных областях науки, им пользуются не только для разделения пигментов, но и для работ с бесцветными веществами. Им пользуется биохимик для выделения и очистки витаминов, гормонов, коэнзимов, не говоря уже об изучении окрашенных растительных объектов; метод этот становится необходимым для

химика при его работах по определению молекулярного веса и строения веществ; очистка веществ идет с помощью адсорбционного метода; наконец, к нему прибегают как к надежному методу при определении подлинности веществ и пользуются им при контроле технических продуктов. С каждым годом метод этот находит себе все новые области применения.

Когда Цвет так настойчиво высказывался за необходимость избегать химических воздействий на вещества, подлежащие выделению из сложных смесей, когда он говорил о неизбежных при этих обработках химических их изменениях и призывал пользоваться методами физическими, против этого не спорили, но оставались безучастными, и за ним не следовали, и по существу дела М. С. Цвет в те годы оставался одиноким. Результаты работ его, хотя и вошли в учебники физиологии растений, их цитировали, но особенно их не пропагандировали, и так дело тянулось свыше двух десятилетий. Сейчас мы видим совершенно другую картину. Адсорбционный метод вызывает живейший интерес у огромного числа исследователей, история его возникновения заинтересовала и пробудила интерес к самой личности автора этого своеобразного и остроумного метода.



М. С. ЦВЕТ

Краткая биография



К сожалению, мы очень мало знаем о М. С. Цвете. Некоторые данные помещены в книге Брике (Briquet) „О женевских ботаниках“.[1] Часть этих данных мы используем, вкравшиеся неточности исправляем. Отдельные сведения мы почерпнули из Известий СПб. Биологической лаборатории, из Трудов Ботанического сада Юрьевского университета, Известий Варшавского университета, Трудов Воронежского государственного университета, Архива Академии Наук и наконец, из работ самого Цвета. К этому мы прибавляем немногие черты, известные нам, лично его знавшим.

Михаил Семенович Цвет родился 19 мая 1872 г. в Италии (г. Асти). Отец его, Семен Николаевич Цвет, был русский, мать, Мария Дороцца, — итальянка. Он учился сперва в Лозанне, в коллеже Гайара (Gaillard), затем в Женеве, в колледже и гимназии, по окончании которой он в 1891 г. поступил там же в университет. Особый интерес он проявлял к химии, физике и ботанике. Лабораторией общей ботаники

[1] Briquet J. Biographie des botanistes à Genève. V. 5a. 1940.

руководил в те годы Тюри (Thury), а затем Шода (Chodat). Этой лаборатории Цвет уделял основное время. Здесь он сделал свои первые исследования, в ней же написал свою диссертационную работу на степень доктора естественных наук („Etudes de physiologie cellulaire“), которую он в 1896 г. защитил в том же Женевском университете. В 1897 г. Цвет переезжает в Петербург и поступает на работу в СПб. Биологическую лабораторию, за год до того основанную П. Ф. Лесгафтом. Вскоре после этого он начинает работать и в академической лаборатории академика А. С. Фаминцына, но никакой официальной должности там не занимает. В 1901 г. при Казанском университете Цвет сдает магистерские экзамены и 21 сентября того же года защищает там диссертацию на степень магистра ботаники—„Физико-химическое строение хлорофильного зерна“. Официальными оппонентами были профессора Я. Я. Гордягин, В. И. Сорокин и Н. В. Сорокин. 1 января 1902 г. Цвет получает должность сверхштатного лаборанта, а позже ассистента и приват-доцента в Варшавском университете, с 1907 г. — профессора ботаники и агрономии в Варшавском ветеринарном институте. После того как в 1908 г. Цвет был избран профессором ботаники и микробиологии в Варшавский политехнический институт, он в 1909 г. оставил работу в университете. 28 ноября 1910 г. М. С. защитил в Варшавском университете диссертацию на степень доктора ботаники — „Хромофиллы в растительном и животном мире“. Официальными оппонентами были ботаники профессора Д. И. Ивановский, В. Ф. Хмелевский и химик проф. В. В. Курилов. За годы работы в Варшаве Цвет несколько раз получал заграничные командировки для работы в библиотеках и для ознакомления с постановкой преподавания в высших учебных заведениях европейских стран. Он не раз ездил также в Петербург и Москву для участия на съездах, где выступал с докладами.

19 апреля 1900 г., по предложению И. П. Бородина, М. С. Воронина и Д. И. Ивановского, Цвет был избран членом СПб. общества естествоиспытателей, кроме того, он впоследствии был членом Варшавского общества естествоиспытателей и немецкого Ботанического общества.

Цвет был хорошим лектором, и в его выступлениях ему был присущ даже элемент известной артистичности. Изредка у него проскальзывали типичные для французского языка ударения на последнем слоге слова: „альфа́“, „бета́“, но вообще русская речь его была чистая, безупречная, хотя детство и юность он провел во французской Швейцарии.

Преподавал Цвет в высших учебных заведениях с интересом, и хотя прямых учеников, которые стали бы в будущем научными работниками, у него не было, молодежь он к работе в лаборатории привлекал, и его последняя анатомическая работа (36, 1907) в значительной части была сделана его сотрудницей Фоминой и студентом Кржесимовским, о чем в тексте работы упомянуто.

В 1915 г. в связи с империалистической войной Цвет вместе с Варшавским политехническим институтом был эвакуирован в Нижний Новгород. Трудности этого периода жизни, повидимому, отразились на его и без того некрепком здоровье.

О последних годах жизни Цвета, к сожалению, почти ничего не известно. Цвет умер еще нестарым человеком — 26 июня 1919 г.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ М. С. ЦВЕТА

1894

1. Sur quelques cas tératologiques dans l'anatomie de Lycium. Bull. de Herbier Boissier, vol. 11, No. 3, pp, 175—179.

1896

2. Sur l'emploi des permanganates dans la microtechnique. Arch. des sc. phys. et nat. 101 année, 4 période, t. I, pp. 481—483. Genève; Bull. du Laborat. de Botan. générale de l'Univer. de Genève. Vol. I, No. 1. pp. 13—15

3. Description d'un idiomètre pour l'étude de transpiration végétale Bull. Labor. Univ. Genève, I, pp. 210—211.

4. Etudes de physiologie cellulaire. Contribution à la connaissance des mouvements du protoplasme, des membranes plasmiques et des chloroplastes. Dissertation présentée à la faculté des sciences de l'Université de Genève pour l'obtention du grade de docteur des sciences. Bull. du Lab. de Bot. génér. de l'Univ. de Genève, vol. I, No. 1, pp. 123—206.

5. Etudes de physiologie cellulaire. I partie. Des membranes plasmiques et des mouvements du protoplasme. Arch. des sc. phys. et nat. 101 année 4 période. t. II. Genève. pp. 228—260,

6. Etude de physiologie cellulaire. II partie. Les chloroplastes. Arch. des sc. phys. et nat. 101 année, 4 per., t. II, pp. 339—348. Genève.

7. Etudes de physiologie cellulaire. III partie. Etude des chloroplaste par la méthode mérotomique. Arch. des sc. phys. et nat. 101 année, 4 pér. t. II, pp. 467—486. Genève.

1898

8. Гемоглобин и хлорофилл. В каком направлении желательно изучение последнего тела. Изв. СПб. Биологич. лаборатории, т. II, вып. 3, стр. 61—65.

1899

9. M. Raciborski. Ein Inhaltskörper des Leptoms. Weitere Mitteilungen über das Leptom. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1898. XVI, 3. 5. (критический реферат). Изв. СПб. Биологич. лаборатории, т. III, вып. 2, стр. 67—69.

10. О новом физико-химическом свойстве протеиновых веществ. Изв. СПб. Биологич. лаборатории т. III, вып. 3, стр. 35—45.

11. Sur la membrane périplasmique. Journ. de bot. Dir. M. Louis Morot XII, pp. 79—82.

12. Ueber die Verknüpfung des äusseren und des inneren Leptoms der Solanaceen durch markständige Leptombündel. Ber. Deutsch. Bot. Ges. XVII S. 231—235.

13. Sur la liquéfaction reversible des albuminoïdes. Comptes rendus. 129 pp. 551—552.

14. Sur la constitution de la matière colorante des feuilles. La chloroglobine. Comptes rendus. 129, pp. 607—610.

15. О хлороглобине. Тр. СПб. об-ва ест., т. 30. вып. 1. № 8, стр. 346—353

1900

16. Das Chloroglobin. Bot. CBL., Bd. 81, S. 81.

17. О природе хлороглобина. Тр. Об-ва ест., т. 31, вып. 1, № 4, стр. 159—163.

18. Sur la liquéfaction reversible. Nouvelle propriété physico-chimique des substances albuminoïdes. Bull. de la Soc. chim. de Paris, III série, t. 23, pp. 309—319.

19. Sur la chlorophylline bleue. Comptes rendus, 131, pp. 842—844.

20. Хлорофиллины и метахлорофиллины. Тр. СПб. о-ва ест., т. 31, вып. 1, стр. 281—291.

21. Sur la pluralité des chl rophyllines et sur les métachlorophyllines. Comptes rendus, 132, pp. 149—150.

22. Vorrichtung zur Beobach'ung von Fluorescenz und Opalescenzerscheinungen. Zeitschr. f. physik. Chemie, 36, S. 450—452.

23. Физико-химическое строение хлорофильного зерна. Экспериментальное и критическое исследование. Тр. Казанского об-ва ест., т. 35, вып. 3, стр. 268, Казань.

1902

24. Recherches sur la constitution physico-chimique du grain de chlorophylle (Extrait des Trav. de la Soc. des Nat. près l'Université de Kazan t. XXXV, livr. 3. 8°, XII. 1 Tafel. Kazan, 1901 (russisch). Bot. Cbl., 89, Ss. 129—123 (автореферат).

25. Методы и задачи физиологического исследования хлорофилла. Дневник XI съезда Русских ест. и врачей, СПб., стр. 523, Тр. СПб. об-ва ест., 33, вып. 1.

26. Микрохимические заметки. Дневник XI съезда Русских ест. и врачей, СПб., стр. 523, Тр. СПб. об-ва ест., 33, вып. 1.

1903

27. О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу. Тр. Варш. об-ва ест., отд. биологии, 14, стр. 20—39. Варшава.

1905

28. Kritische Bemerkungen zu Molisch's Arbeit über die Phaeophyceen Farbstoffe. Bot. Zeit., 63, II, Ss. 273—278.

1906

29. Zur Ultramikroskopie. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 24, S. 234.

30. Zur Kenntnis der Phaeophyceen-Farbstoffe. Ber. Deutsch. Bot, Ges. 24, Ss. 235—244.

31. Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Absorbtionen. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 24, Ss. 316—323.

32. Absorbtionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf· die Chemie des Chlorophylls. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 24, Ss. 384—393.

1907

33. Zur Chemie des Chlorophylls. Ueber Phylloxantin, Phyllocyanin und die Chlorophyllane. Bioch. Ztschr., B. 5, Ss. 6—32.

34. Zur Geschichte der Chlorophyllforschung. Antwort an Herrn Marchlewsky. Ber. Deutsch. bot. Ges. 25, S. 71—74.

35. Spektralanalytische Untersuchungen über die Chlorophylline und deren ächste Säurederivate (Chlorophyllane), (mit Tafel). Ber. Deutsch bot. Ges. 5, S. 137—149.

36. Recherches anatomiques sur les hydatodes des Lobeliaceae. Nouveau type de stomates aquifères. Revue générale de botanique, 19, pp. 305—316

37. Ueber die Spektrophotometrie der Chlorophylline und die Energetik des Chlorophylls, Ber. Deutsch. bot. Ges., 25, S. 388—397.

38. Nochmals über das Phylloxantin. Bioch. Zeitschr., 6, S. 373—378.

1908

39. Ueber die nächsten Säurederivate der Chlorophylline. Ber. Deutsch. chem. Ges., 41, S. 1352—1354.

40. Ueber die Verfärbung und Entleerung des absterbenden Laubes. Ber. Deutsch. bot. Ges., 26a, S. 88—93.

41. Ueber das Pigment des herbstlich vergilbten Laubes. Ber. Deutsch. bot. Ges., 26a, S. 94—101.

42. Ist der Phosphor an dem Aufbau der Chlorophylline beteiligt? Ber. Deutsch. bot. Ges., 26a, S. 214—220.

43. Ueber das Phaeophytin und die Chlorophyllane nebst Schlussbemerkungen über Phylloxantin. Biochem. Z., 10, S. 404—413.

44. Ueber die Natur des sogenannten „kristallisierbaren“ Chlorophylls (Metachlorophyllins). Biochem. Z,, 10, S. 414—424.

45. Das neue System der sogenannten „Chlorophyllderivata“. Biochem. Z. 10, S. 426—429.

46. La substance chimique verte nommée chlorophylle, existe-t-elle? Rev. génér. de Botan., 20, pp. 328—331.

1910

47. Хромофиллы в растительном и животном мире. Варшава, 379 стр.

48. Das sogenannte „Kristallisierte" Chlorophyll in Gemisch. Ber. Deutsch chem. Ges., 43, S. 3139—3141.

49. Адсорбционный анализ так называемого „кристаллического хлорофилла". Журн. Русск. физико-химич. об-ва, XLII, в. 8, 1385—1387.

1911

50. Eine Hypothese über den Mechanismus der photosynthetischen Energieübertragung. Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. 76, S. 413—419.

51. Ueber die Dualität der Chlorophyllane. Biochem. Z., 31, S. 505—506.

52. Sur une nouvelle matière colorante végétale, la thuyorhodine. Comptes rendus, 152, pp. 788—789.

53. Ueber die Löslichkeitsverhältnisse der Chlorophylline und eine neue Methode zur Isolierung derselben. Ber. Deutsch. chem. Ges., 44, S. 1124—1127

54. Sur un nouveau réactif colorant de la callose. Comptes rendus, 153, pp. 503—505.

55. Ueber den makro- und mikrochemischen Nachweis des Carotins. Ber Deutsch. bot. Ges., 29, S. 630—636.

56. Ueber Reicherts Fluorescenz-Mikroscop und einige damit angestellten Beobachtungen über Chlorophyll und Cyanophill. Ber. Deutsch. bot. Ges., 29. Heft 10, S. 744—746.

57. Реферат о брошюре: „Кононов, В. К. Краткий очерк анатомии растений в микроскопических препаратах". Составлен под ред. и с введением А. Генкеля. Тр. Бот. сада Юрьевск. ун-та, XII, вып. 1, стр. 74—76.

1912

58. Современное состояние химии хлорофилла. Журн. Русск. физико-хим. об-ва. 44, стр. 449—464.

59. L'état actuel de nos connaissances sur la chimie de la chlorophylle. Rev. génér. Sc. pures et appliquées, 23, pp. 141—148.

1914

60. Beiträge zur Kenntnis der Anthocyane. Ueber künstliches Anthocyan. Biochem., Z, 58, S. 225—235.

61. Об искусственном антоциане. Изв. Имп. Академии наук. VI серия, т. VIII, стр. 115—124.

62. Zur Kenntnis des „vegetabilischen Chamäleons". Ber. Deutsch. bot Ges., XXXII, S. 61—68.



Б. Я. СВЕШНИКОВ

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

„Подобно световым лучам в спектре, различные компоненты сложного пигмента закономерно распределяются друг за другом в столбе адсорбента и становятся доступными качественному и количественному определению".

М. С. ЦВЕТ



Открытие новых аналитических и препаративных методов всегда является очень ценным стимулом в развитии науки. Особенно велика роль этих методов в неорганической, органической и биологической химии, а также в физиологии и медицине. Блестящим примером могут служить изумительные успехи, достигнутые за последние 10—15 лет с помощью так называемого „хроматографического" метода, в химии витаминов, гормонов, энзимов, в анализе сложнейших естественных смесей органических веществ. Этот замечательный метод был создан в 1903—1906 г. М. С. Цветом.

Идея метода Цвета очень проста. Исследуемый раствор

протекает в строго определенном направлении через столб, наполненный адсорбентом. В этом случае отдельные компоненты смеси будут располагаться по последовательным слоям в направлении убывающего адсорбционного сродства исследуемых веществ к адсорбенту. Основное преимущество хроматографического метода перед другими в том, что он дает исключительно тонкий способ разделения смеси родственных химических соединений. „Метод Цвета, — отмечают в своей книге Цехмейстер и Чолноки (1938), — осуществил заветную мечту химика разделить до анализа смесь на ее компоненты".

Специалист по хроматографии Стрэйн в своей монографии (1942) пишет: „В 1906 г. в Варшаве был предложен новый остроумный метод химического анализа, которому предназначено оказать влияние на жизнь человечества и всего живого мира. Он позволяет осветить сложнейшие процессы природы, как-то: процессы питания, влияние гормонов на вид и характер людей и животных. Благодаря ему в сложном механизме живой клетки были обнаружены реакции, ранее не снившиеся и во сне".

Член Английского Королевского Общества, профессор органической химии Гейльброн заканчивает свое предисловие к английскому переводу (1943) книги Цехмейстера и Чолноки следующими словами: „Я надеюсь, что в результате этих условий будет создано еще более сильное стремление к внедрению этой очаровательной техники, которая имеет неоценимые заслуги в различных областях органической и биологической химии".

Хотя Академия Наук премировала докторскую диссертацию Цвета, однако, на совести его современников лежит темным пятном тот факт, что труды скромного профессора Варшавского Политехнического института находились в забвении более двух десятилетий. Это тем более поразительно, что хроматографический метод был разработан автором настолько, что современная хроматография окрашенных

соединений в отношении методики не многим отличается от методики, предложенной Цветом. Больше того, в период 1906—1912 гг. метод был оправдан автором на целом ряде примеров. Повидимому, одной из причин того, что метод не получил признания в тот период, был неблагоприятный отзыв, данный о нем знаменитым Вильштеттером (1912—1913). К сожалению, война 1914—1918 гг., потеря лаборатории и преждевременная смерть помешали Цвету защитить свой метод достойным образом. Не привлекли также надлежащего внимания к методу и одиночные работы по хроматографии, появившиеся в период 1910—1931 гг.

Расцвет хроматографии начинается с 1931 г., когда Кун, Ледерер и Винтерштейн достигли изумительных успехов в анализе каротинов—задаче многолетней давности; при этом оправдалось предсказание Цвета: „Очень возможно, что каротин листа отнюдь не индивидуальное химическое вещество, но смесь двух или нескольких гомологов, которые нужно будет разделить с помощью соответствующих адсорбентов". Вследствие большого значения каротиноидов, этих естественных предшественников витамина А, работы указанных авторов сразу привлекли внимание ученых всего мира. В ближайшие же годы метод Цвета был применен к анализу многих важнейших растительных и животных пигментов и продуктов их изменения. Одновременно был внесен ряд улучшений в методику работы.

Большое число ученых и многочисленные лаборатории успешно работают над различными применениями метода Цвета и над его дальнейшим развитием. О размахе работ по хроматографии достаточно ярко свидетельствует тот факт, что за 10 лет, прошедших после первых работ Куна, Ледерера и Винтерштейна, опубликовано более 700 статей посвященных в основном различным применениям этого метода, написаны две монографии, из которых одна выдержала два издания и переведена на английский язык, и взяты

десятки патентов как на способы выделения различных веществ, так и на рецепты изготовления адсорбентов.

Прискорбно отметить недостаточное внимание к методу у нас — на родине выдающегося соотечественника. Можно указать лишь одиночные статьи и несколько обзоров. В то время как за границей метод широко популяризуется, помимо монографий излагается во многих руководствах по химии, биологии, — в основных руководствах по этим дисциплинам, написанных нашими авторами, хроматографический метод либо совершенно не упоминается, либо он излагается настолько кратко в такой форме, что у читателя не остается сомнений в „малой пригодности“ этого метода для аналитической и препаративной работы. В целях широкого распространения метода было бы желательно помещать в специальных журналах обзоры по применению метода к соответствующей области науки и промышленности. Несколько обзоров такого типа появилось в заграничной литературе в самые последние годы.

ОСНОВНЫЕ ЗАДАЧИ, РЕШАЕМЫЕ С ПОМОЩЬЮ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА

Хроматографический метод является инструментом исключительной ценности для всех областей знания, связанных с изучением химических соединений и их реакций. Важнейшие проблемы, разрешаемые с помощью этого метода, следующие:

1. Разделение сложной смеси на ее компоненты.
2. Определение степени однородности химических соединений. Очистка от примесей.
3. Выделение веществ из весьма разбавленных растворов.
4. Определение идентичности двух веществ и контроль технических продуктов.
5. Количественное определение одного или нескольких компонентов сложной смеси.
6. Определение молекулярной структуры.

1. РАЗДЕЛЕНИЕ СЛОЖНОЙ СМЕСИ НА ЕЕ КОМПОНЕНТЫ

Одно из самых распространенных применений хроматографического анализа — разделение сложной смеси на отдельные компоненты. Методика, которой пользуются для этой цели, была детально разработана самим Цветом. Раствор испытуемой смеси пропускают через стеклянную трубку, наполненную порошкообразным адсорбентом. Отдельные компоненты смеси при этом располагаются в виде узких, слегка перекрывающихся полос в самой верхней части столба адсорбента. Полученная таким образом хроматограмма весьма неотчетлива. Ее „проявляют", т. е. просасывают через столб адсорбента тот же или другой растворитель, в результате чего все зоны смещаются книзу и, что особенно важно, смещаются неодинаково. При соответствующем подборе растворителя можно, очевидно, отдельные зоны смывать со столба адсорбента (элюировать) с тем, чтобы затем исследовать содержимое раствора, прошедшего через адсорбент, обычными химическими методами. Для препаративных целей употребителен другой, более универсальный метод: столб адсорбента осторожно выталкивают на стекло или бумагу и разрезают скальпелем по зонам.

Хорошее разделение адсорбированных соединений зависит от различных условий, среди них важнейшие: 1) выбор адсорбента, в частности имеют значение размеры его частиц, плотность и однородность набивки, 2) выбор растворителя для получения хроматограммы и для ее проявления и 3) концентрация растворенного вещества. Для получения совершенно воспроизводимых результатов лучше всего употреблять стандартизованные адсорбенты. Такие адсорбенты выпускаются в продажу иностранными фирмами.

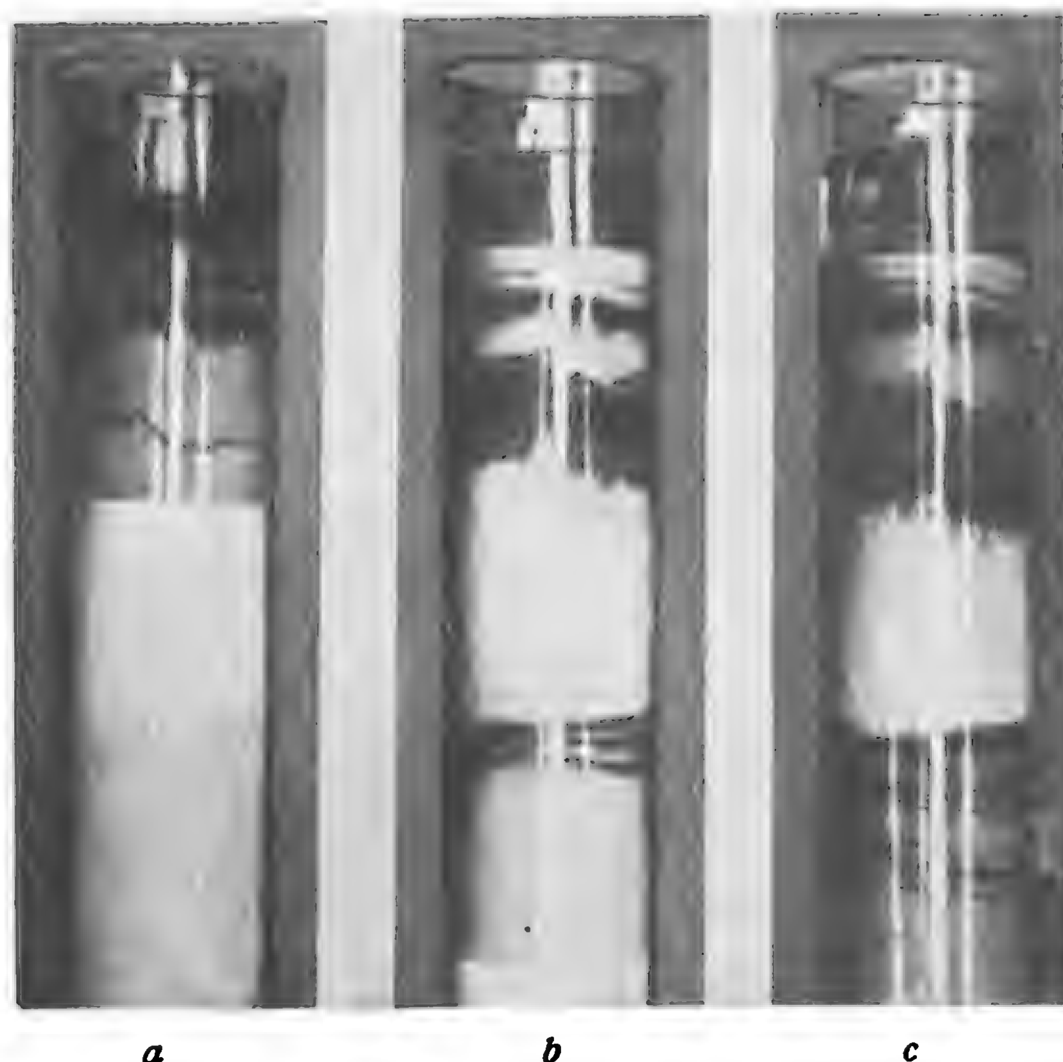
Основным положением хроматографического метода, на чем, собственно, и основано его многостороннее применение,

является утверждение, что вид хроматограммы мало зависит от случайных сопровождающих веществ. Случайные спутники могут давать лишь добавочные зоны, не вызывая сколько-нибудь значительных искажений остальных зон. Однако существуют случаи, когда наблюдается явное изменение нормальной хроматограммы: все зоны кажутся ненормально расширенными и запутанными, как будто бы происходит сильное вымывание адсорбата. Это имеет место когда сопровождающее вещество находится в очень большом количестве и понижает адсорбционную активность адсорбента. Адсорбционные изотермы протекают при этом совсем иначе, чем для чистых соединений. Такие случаи, например, наблюдаются при получении хроматограмм животных липохромов, когда имеется большой избыток жира или холестерина.

Повторное пропускание испытуемого раствора через несколько трубок с адсорбентом обычно дает возможность в конце концов получить хорошую хроматограмму, так как абсолютное количество сопровождающих веществ быстро падает от колонки к колонке. В ряде случаев более практичным является предварительное разделение испытуемой смеси с помощью обычных химических методов: кристаллизации, разделения с помощью двух несмешивающихся растворителей, сапонификации, дестилляции и т. д.

Классическим примером применения метода Цвета для аналитических и препаративных целей может служить разделение каротиноидов. Эти пигменты очень распространены в растительном и животном мире и имеют большое значение в питании и развитии организма, выполняя роль витаминов или гормонов. Число индивидуальных соединений в естественных продуктах может быть очень велико. Так, по Цехмейстеру и Чолноки, кожура спелых плодов испанского перца содержит до 100 индивидуальных пигментов (каротиноидов). Присутствие такого огромного количества кароти-

ноидов объясняется тем, что в растениях встречаются не только сами углеводороды типа каротинов, но и полиеновые алкоголи, полиеновые эфиры, полиенкарбоновые кислоты и полиенкетоны.



a *b* *c*

Рис. 1. Стадии последовательного проявления хроматограммы (вытяжка из перца, адсорбент вверху— $CaCO_3$, внизу $Ca(OH)_2$; растворитель— бензин).

a — непосредственно после протекания исследуемого раствора; *b*—недостаточно проявленная; *c* — проявленная хроматограмма (по Цехмейстеру и Чолноки).

Разумеется, разложение такой сложной смеси в одной колонке невозможно. Испытуемый раствор пропускается через несколько колонок с адсорбентами, причем в некоторых случаях при переходе к следующей колонке изменяется и растворитель. На рис. 1 изображена одна из хроматограмм, получаемая при разложении смеси каротиноидов.

Приведем один пример, иллюстрирующий большую чувствительность метода. Кун и Грундманн (1933) показали,

что три каротиноида, которые часто встречаются вместе: β-каротин [$C_{40}H_{56}$], криптоксантин [$C_{40}H_{55}OH$] и зеаксантин [$C_{40}H_{54}(OH)_2$], обладают одинаковыми спектрами адсорбции, но легко различаются по адсорбции на гидроокиси алюминия.

Большое практическое значение хроматографического анализа, как инструмента необычайно тонкого разделения родственных соединений, можно иллюстрировать на примере разделения естественного хлорофилла на индивидуальные соединения.

Впервые хлорофилл был разделен на его индивидуальные компоненты Цветом. Отвергая метод Цвета как несостоятельный, Вильштеттер предложил свой „надежный“ и необычайно трудоемкий метод получения индивидуальных хлорофиллов, но через 20—25 лет Винтерштейн и Штейн (1933), а также ряд других авторов полностью реабилитировали метод Цвета. Этот метод стал в настоящее время излюбленным для получения препаратов хлорофилла, значительно превосходящих по чистоте препараты, приготовленные по методу Вильштеттера, причем в отличие от последнего адсорбционный метод во много раз сокращает время, потребное для препаративной работы — обстоятельство, играющее чрезвычайно важную роль в биохимических исследованиях, где препаративная работа занимает часто бо́льшую часть времени исследователя.

После открытия витамина А долгое время не существовало критерия для химической и физиологической чистоты препарата. Это приводило к целому ряду недоразумений и противоречивых результатов. Правда, Карреру (1939) удалось в конце концов разработать весьма утомительный способ получения чистых препаратов путем многократной дестилляции и кристаллизации, но им же и рядом других авторов было показано, что хроматографический метод дает тот же результат в несоизмеримо более короткий срок. Более того, тщательное разделение смеси, состоящей из

сотни каротиноидов, с помощью адсорбционных методов позволило установить чрезвычайно важный факт, что активностью витамина А обладает не только то соединение, которое всеми признано, как витамин А, но и ряд других каротиноидов.

В последние годы разделение с помощью хроматографического метода сложных естественных смесей и получения чистых индивидуальных препаратов, имеющих практическое значение, усердно патентуется; в качестве примера можно указать патент на получение индивидуальных алкалоидов спорыньи.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ЧИСТОТЫ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ. ОЧИСТКА ОТ ПРИМЕСЕЙ

Определение степени чистоты продажного или приготовленного индивидуального вещества и очистка его от трудно отделяемых примесей являются одной из актуальных задач современной химии. Хроматография представляет для этого надежные и сравнительно простые методы.

Вещество является однородным в хроматографическом смысле, если оно не может быть разделено адсорбентами.

За редкими исключениями, которые мы укажем ниже, эта однородность действительно соответствует химической однородности. Испытание однородности адсорбционными методами обычно обеспечивает более высокую точность, чем принятые в химической практике методы определения однородности по точке плавления и кипения. Это объясняется тем, что разница в адсорбционной способности гораздо более чувствительна к небольшим изменениям в строении молекул, чем точка плавления и кипения.

Классический метод фракционированной кристаллизации во многих случаях уступает адсорбционным методам в силу, того, что разница в растворимости химически родственных

индивидуумов часто ниже, чем разница в адсорбционной способности.

В огромном большинстве случаев хроматографические методы оказываются также более чувствительными, чем контроль чистоты по спектрам поглощения, так как поглощение ничтожных концентраций трудно обнаружимо на фоне большого поглощения основного вещества, тем более что спектры поглощения основного вещества и родственной ему примеси обычно лежат в той же области.

Что касается границ приложимости адсорбционных методов испытания вещества и однозначности результатов такого испытания, то здесь надо иметь в виду следующие факты: возможно, во-первых, существование двух таких соединений которые обладают практически одной и той же адсорбционной способностью. Однако, если мы примем во внимание, что адсорбция определяется не только адсорбентом, но и растворителем, то следует согласиться с утверждением Цвета: „совершенно невероятно, чтобы адсорбционные изотермы двух веществ изменялись вполне одинаково при всех вариациях среды и адсорбента“. Поэтому образование одной единственной зоны на целом ряде адсорбентов является вполне убедительным доказательством химической однородности. Однако обратное утверждение не всегда справедливо. Адсорбционная способность частиц, например, зависит от степени их дисперсности, поэтому для полидисперсных растворов хроматограмма может оказаться далеко не простой, хотя вещество в химическом смысле однородно. С другой стороны, надо не забывать о возможности реакции между адсорбентом и адсорбатом. Возникающие при этом новые соединения могут давать добавочные зоны.

Насколько здесь надо быть осторожным, можно иллюстрировать историей открытия хлорофилла C. Этот третий компонент хлорофилла впервые был наблюден Чейлем (1934), применившим для хроматографического анализа хлоро-

филла в качестве адсорбента тальк. Однако Винтерштейн и Шён (1934), Маккинни (1940) и др., применявшие, аналогично самому Цвету, для разделения хлорофилла мягкие органические адсорбенты: сахарозу, крахмал и др., не подтвердили открытия Чейля.

В отдельных случаях хроматографический метод очистки неприменим, потому что не удается найти никаких практически удобных адсорбентов для данной группы веществ: примером могут служить сернистые соединения. Многочисленные попытки очистить бензин от сернистых соединений с помощью адсорбционного метода до сих пор не увенчались успехом.

Испытание адсорбционными методами многих „чистейших" продуктов, имеющихся в продаже, показало, что они являются достаточно загрязненными. В качестве примера приведем результаты хроматографического анализа кальбаумского антрацена. При рассматривании хроматограммы такого антрацена в свете люминесценции (адсорбент Al_2O_3, растворитель и проявитель — бензин с метанолом) Цехмейстер и Чолноки обнаружили пять зон: две очень узкие яркожелтые зоны (принадлежащие неизвестным примесям), затем находилась яркоголубая зона, принадлежащая карбазолу (0.05%), ниже находилась дающая желтую флюоресценцию зона нафтацена, и в самом низу располагалась широкая зона антрацена, дающего синюю флюоресценцию.

Вследствие карциногенного действия 1,2-бензопирена и других полициклических углеводородов значительное внимание было уделено очистке этих соединений. В большинстве случаев она выполнялась с помощью адсорбционных колонок.

Хроматографическим методом в настоящее время с успехом пользуются для определения степени чистоты многих красителей. Так, например, исследования конго красного, эозина, эритрозина, бенгальской розовой и ряда красителей,

употребляемых в медицине, показали, что выпускаемые в продажу индивидуальные красители загрязнены различными примесями. Под постоянным контролем хроматографического анализа были разработаны новые улучшенные способы приготовления, обеспечивающие требуемую чистоту препаратов.

3. ВЫДЕЛЕНИЕ ВЕЩЕСТВ ИЗ ВЕСЬМА РАЗБАВЛЕННЫХ РАСТВОРОВ

Хроматографические методы, пригодные для обнаружения ничтожных примесей и очистки от них, могут быть с успехом применены и для решения обратной задачи — обнаружения и выделения из естественных продуктов веществ, находящихся там в ничтожных концентрациях. Исключительную ценность метод представляет для биохимических исследований. Выбрав подходящий адсорбент, можно иногда с помощью небольшого столба адсорбирующего вещества адсорбировать желаемое вещество из многих гектолитров раствора и избавиться от выпаривания огромного объема. Последнее для биохимических задач тем более затруднительно, что, в силу большой чувствительности некоторых биохимических веществ к нагреванию, выпаривание надо вести при невысокой температуре.

Блестящими примерами применения хроматографического анализа для решения задач указанного типа могут служить работы по изготовлению чистых препаратов различных птеринов. Эта группа соединений замечательна своим высоким содержанием азота и принадлежит к пуриновым соединениям. Значение пуринового (белкового) обмена для организма и специфичность действия некоторых птеринов [1]

---

[1] Кроу указывает в своих статьях (1936), что некоторые птерины являются, наравне с флавинами, ферментами окисления тканей.

делают понятным тот исключительный интерес, который проявляет к ним современная биология и физиология. Между тем концентрации отдельных птеринов в вытяжках из тканей или в выделениях организма измеряются миллионными долями процента, и птерины очень чувствительны к различным воздействиям. Поэтому только применение метода Цвета позволило японскому ученому Кошара (1936) выделить из 5000 литров мочи 3,8 мг уроптерина и немецким химикам Бекеру и Шопфу (1936) несколько миллиграммов эритроптерина из миллиона крылышек бабочек определенного вида.

Трудно переоценить роль адсорбционного анализа в приготовлении чистых препаратов почти всех витаминов. Мы уже упоминали о получении чистого препарата витамина А. С большим успехом метод Цвета был применен для выделения витамина Е. Этот витамин размножения содержится в маслах, получаемых из ростков различных растений. Первоначально пытались получить его в концентрированном виде путем перегонки упомянутых масел в высоком вакууме, однако Друммонд, Зингер и Макуолтер (1935) показали, что для этой цели удобнее пользоваться адсорбционными методами.

Столь же успешно метод Цвета применяется для получения эргостерола — провитамина D, витаминов B_1 и B_2, а также для выделения, разделения и очистки витаминов P_1 и P_2. Некоторые из вышеперечисленных способов приготовления чистых препаратов витаминов запатентованы.

Тщательное изучение свойств чистейших препаратов различных витаминов, гормонов и некоторых ферментов открыло исключительные возможности для физиологической химии, в частности оно позволяет обнаруживать ничтожные количества этих веществ в различных тканях и выделениях, причем опять-таки рабочим методом является несколько

измененный метод Цвета. Мы имеем в виду здесь хроматографический микроанализ.

Применение адсорбционных колонок с очень узким сечением для обнаружения ничтожных количеств тех или иных веществ вряд ли требует особых пояснений. Вполне очевидно, что ширина полосы, образованной тем или иным соединением, определяется как количеством данного вещества, так и размерами колонки. Так, опыты с вышеупомянутыми птеринами показали, что для того, чтобы получить в капиллярной колонке хорошо заметную зону эритроптерина шириною в 1 мм, достаточно $5 \cdot 10^{-6}$ г этого вещества. Ксантоптерин хорошо обнаруживается даже в количестве $1 \cdot 10^{-6}$ г.

Чтобы почувствовать достаточно осязательно, какие горизонты открывают эти методы для биологии, укажем, что с помощью хроматографического микрометода Кроу (1944) мог получить последовательный ряд хроматограмм экстракта из дифтерийного токсина и выделить среди продуктов, синтезированных бактериями, флавины и птерины. Применяя хроматографические методы, Вагнер-Яурегг (1937) мог определить ряд соединений, входящих в состав коричневого жира туберкулезных бацилл.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИДЕНТИЧНОСТИ ДВУХ ВЕЩЕСТВ. КОНТРОЛЬ ТЕХНИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ

Два индивидуальных вещества считаются идентичными в хроматографическом смысле, если их смесь на различных адсорбентах и из различных растворителей не может быть разделена на две зоны.

На примере каротиноидов мы видели, что различия, устанавливаемые этим методом, часто тоньше, чем различия, устанавливаемые другими методами.

Если смесь двух веществ, испытываемых на идентич-

ность, дает хроматограмму, имеющую два слоя, то для того, чтобы решить, какое вещество соответствует данной зоне, добавляют в смесь избыток одного из веществ и наблюдают, какая зона начинает расширяться при этом.

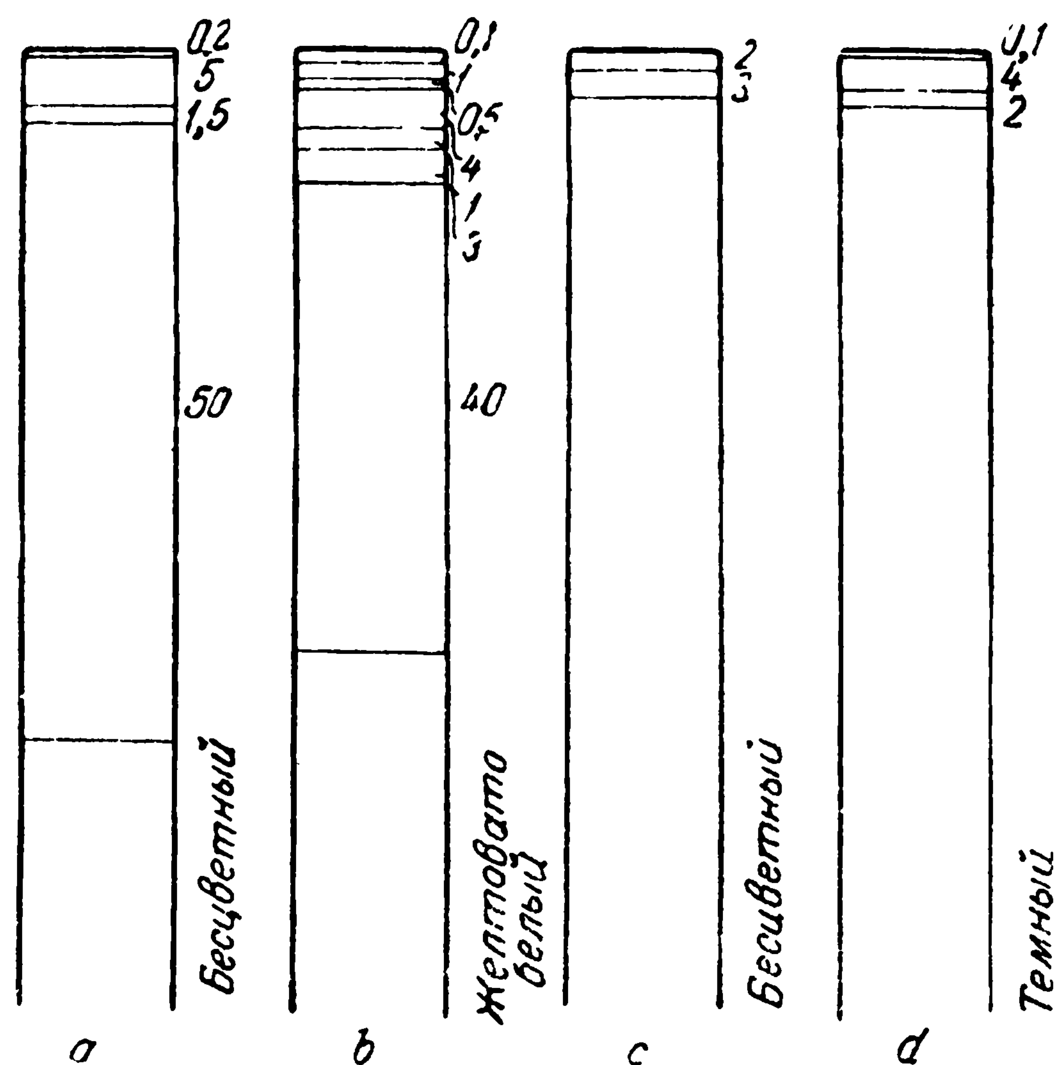


Рис. 2. Хроматограммы сливочного масла

(растворитель — бензол, адсорбент Al_2O_3): *a* — при дневном свете: 0.2 — зеленоватый, 5—бесцветный, 1,5—светлокоричневый, 50 — коричневый; *b* — то же в свете люминесценции: 0,1 — розовый, 4 — сине-зеленый, 1 — светложелтый, 3 — серовато-желтый, 40—коричневый; *c* — на кларите при дневном свете: 2 — светлосиний, 3 — розовый; *d* — то же в свете люминесценции: 0,1—огненнокрасный, 4—темный, 2—желтозеленый (цифры сбоку указывают щирину слоя в миллиметрах).

Хроматографические методы установления идентичности в последние годы широко внедряются в товароведение. С особым успехом этот метод был применен для контроля фармацевтических продуктов, дубильных экстрактов, технических масел и жиров, вин и естественных красителей. Для целей практического контроля, конечно, не требуется

такая хроматограмма, которая давала бы возможность получить исчерпывающий химический анализ данного вещества; достаточно получить лишь такое разделение на компоненты, которое обеспечило бы точное опознавание данного вещества и позволило бы обнаружить возможные фальсификации.

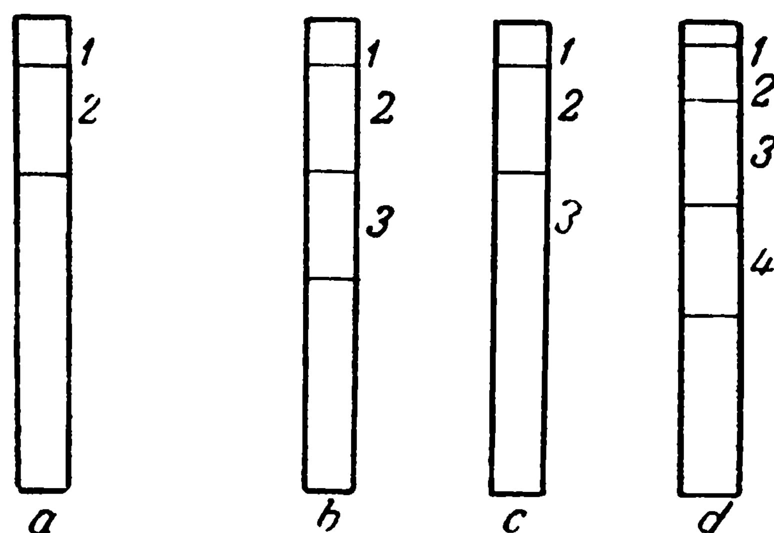


Рис. 3. Хроматограммы галеновых препаратов Tinctura ipecacuanhae:
a — в дневном свете: 1 — грязнозеленый, 2 — светложелтый; *b* — в свете люминесценции: 1 — красный, 2 — желтый, 3 — светлоголубой; Tinctura belladonnae; *c* — в дневном свете, 1 — зеленый, 2 — светлозеленый; *d* — в свете люминесценции: 1 — желтый, 2 — темнозеленый, 3 — зеленый, 4 — светлоголубой (по Цехмейстеру и Чолноки).

На рис. 2 и 3 воспроизведен в схематическом виде ряд хроматограмм для сливочного масла и фармацевтических препаратов. Как видно из рисунков, число признаков, даваемых хроматограммами для установления идентичности двух веществ, достаточно велико.

5. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОДНОГО ИЛИ НЕСКОЛЬКИХ КОМПОНЕНТОВ СЛОЖНОЙ СМЕСИ

Приблизительную количественную оценку содержания отдельных компонентов в растворе можно получить по ширине и интенсивности окраски полос. Более точно это может быть выполнено путем вымывания (элюирования) вещества из данной зоны и определения его количества в элюате обычными аналитическими методами. Однако при этом надо учитывать то обстоятельство, что элюирование редко бывает полным и уже в процессе получения хроматограммы часть вещества может оказаться в растворе, прошедшем через колонку. В силу этого, для точного количественного определения более простым является тот предельный случай,

когда вещество, концентрацию которого желательно определить, вовсе не адсорбируется в колонке, а сопровождающие его вещества сильно адсорбируются.

В качестве примера можно привести количественное определение концентрации каротина. Для этой цели экстракт из высушенных и измельченных листьев пропускается через колонку, наполненную карбонатом кальция или магнезии. Сильно адсорбирующиеся хлорофиллы и желтые ксантофиллы задерживаются адсорбентом, и прошедший раствор содержит лишь каротины и некоторые бесцветные примеси, поэтому простое колориметрическое сравнение дает возможность определить содержание каротина.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ

Большой экспериментальный материал по применению хроматографического анализа, накопленный за последние 10 лет, позволяет уже сейчас пролить некоторый свет на связь между адсорбционной способностью и структурой. Разумеется, пока сделаны первые шаги в этом направлении, но можно надеяться, что в недалеком будущем метод будет служить ценным дополнением к сложным аналитическим методам выяснения структуры молекулы.

Адсорбционная способность органических соединений прежде всего определяется их природой и числом полярных групп в молекулах. Весьма ориентировочно можно расположить органические соединения в порядке убывания их адсорбционной способности следующим образом: 1) кислоты и основания, 2) гидроксильные соединения, амино- и тиосоединения, 3) альдегиды, кетоны и эстеры, 4) галоидные соединения, 5) ненасыщенные углеводороды, 6) насыщенные углеводороды.

Такое деление, однако, не учитывает всех факторов,

определяющих адсорбционную способность молекул. Последняя зависит от размеров молекулы (большие молекулы адсорбируются сильнее, чем малые молекулы того же класса), от стереоизомерных изменений (рис. 4) и от изменений поляризуемости замещающих групп в зависимости от их по-

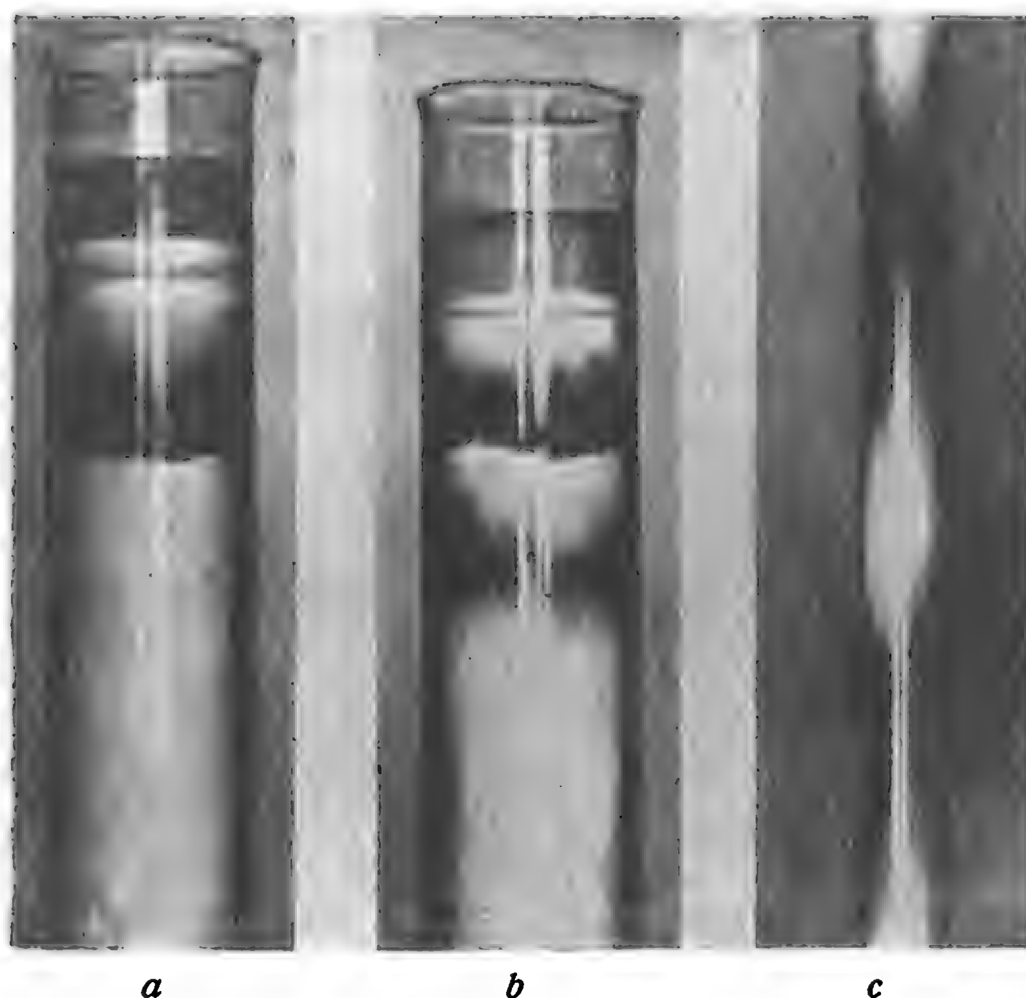


Рис. 4. Обнаружение изомеризации:

a — хроматограмма свежеприготовленного раствора ликопена. За исключением очень тонкой верхней полосы хроматограмма гомогенна; *b* — хроматограмма того же раствора, что и в *a*, но после соответствующей термической обработки. Внизу заметна новая зона неоликопена; *c* — разделение cis и trans азобензола (trans — вверху) (по Цехмейстеру и Чолноки).

ложения в молекуле. Чем сложнее остов молекулы и чем больше число полярных замещающих групп, тем труднее сделать какие-либо заключения о структуре молекулы из положения данного соединения на адсорбционной колонке. Среди органических соединений данного класса, однако, можно подметить определенную закономерность между химической структурой и адсорбируемостью молекул.

В гомологических сериях органических соединений адсорбционная способность возрастает с увеличением числа двойных связей, как это показывают таблицы 1, 2, 3.

Для дифенилполиеновых соединений (табл. 3) существует тесная связь между адсорбируемостью и цветом. Последний для этих соединений определяется числом сопряженных двойных связей. Подобное же соотношение между цветом, адсорбционной способностью и числом двойных связей было найдено для изомерных каротинов. Переход от каротинов к ксантофиллам, связанный с добавлением таких полярных групп, как гидроксилы, резко увеличивает адсорбционную способность, не изменяя цвета.

Среди изомерных соединений, например среди изомеров полициклических соединений, нет никакого простого соотношения между числом двойных связей и адсорбируемостью (табл. 4).

Адсорбционная способность стереоизомеров: изомеров положения, цис- и трансизомеров, по данным Арнольда (1939), связана с их дипольным моментом. Изомеры, обладающие более высоким дипольным моментом, адсорбируются сильнее.

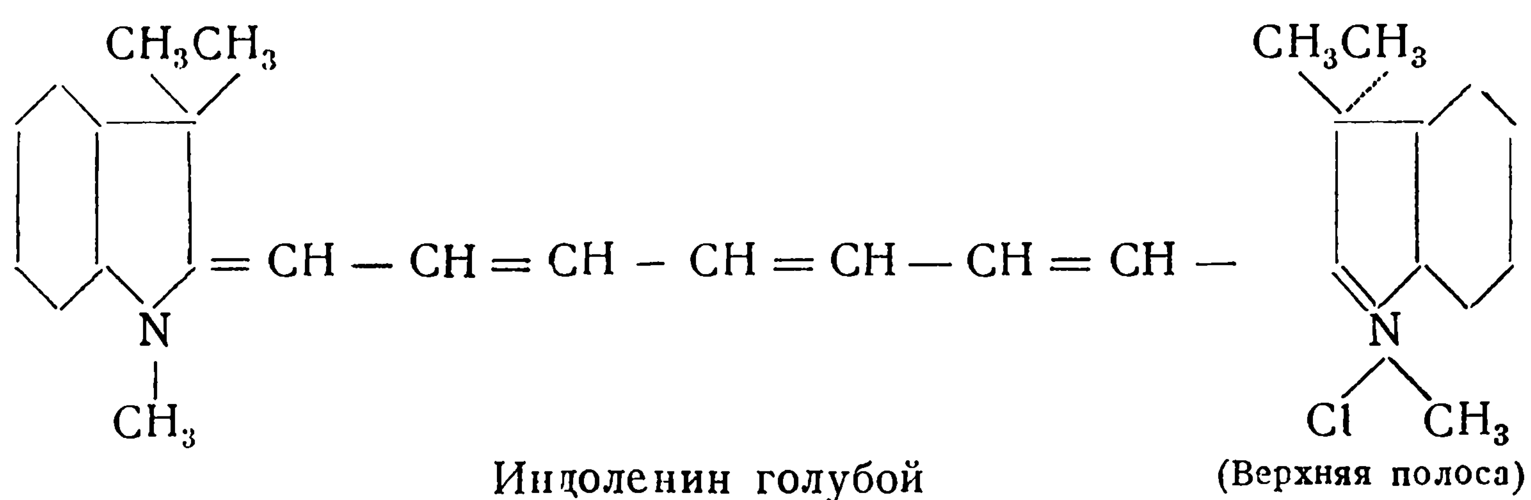
Следует отметить, что в некоторых случаях, как показали Гендерсон и Рул (1938), можно разделить оптические изомеры.

Естественно, что хроматографический метод позволяет также открыть изменения в структуре, вызываемые химическими реакциями. Например, если в процессе реакции удаляются полярные группы, то возникающие соединения обладают меньшей адсорбционной способностью, чем первоначальные. В частности, это имеет место при образовании эстеров из алкоголей и жирных кислот.

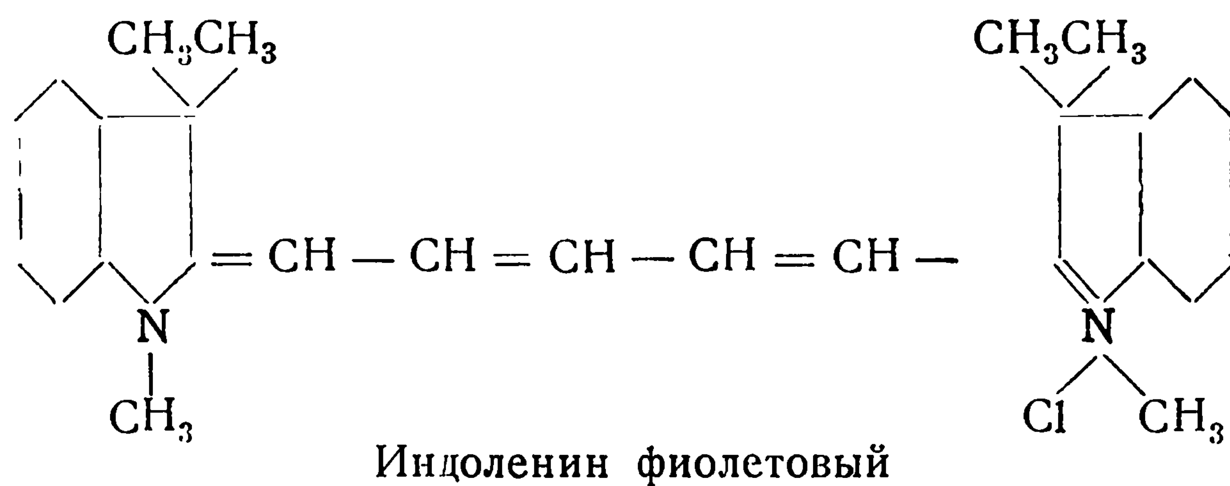
В настоящее время еще слишком рано говорить о применении хроматографического метода для решения обратной задачи — выяснения неизвестной структуры по адсорбционной способности. Однако, в отдельных случаях некоторые

ТАБЛИЦА 1

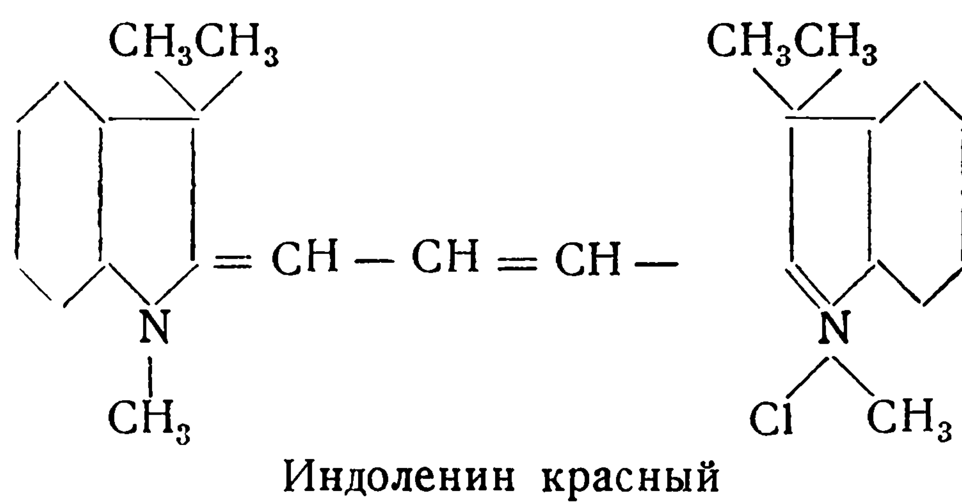
Адсорбционный ряд некоторых индолениновых красителей
(по Руггли и Янсену, 1935)



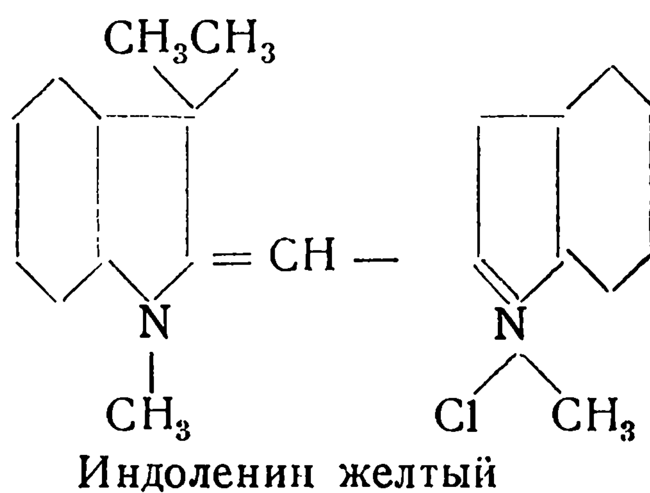
Индоленин голубой (Верхняя полоса)



Индоленин фиолетовый



Индоленин красный

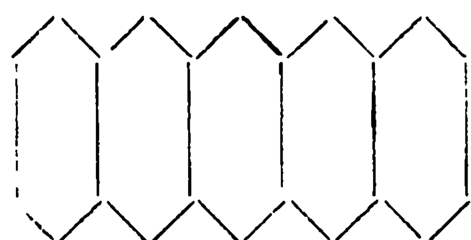


Индоленин желтый

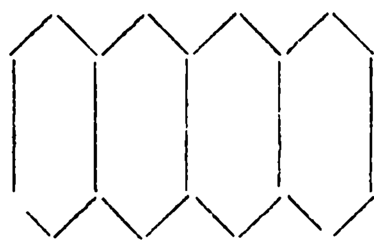
ТАБЛИЦА 2

Адсорбционный ряд некоторых линейных полициклических соединений

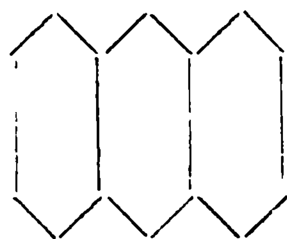
(по Винтерштейну, 1934)



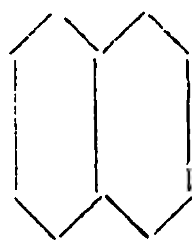
2, 3, 6, 7 — Дибензантрацен
(Верхняя полоса)



Нафтацен



Антрацен



Нафталин



Бензол

ТАБЛИЦА 3

Соотношение между адсорбируемостью и числом этиленовых групп в дифенилполиенах

(по Куну и Винтерштейну, 1928; Винтерштейну и Шёну, 1934)

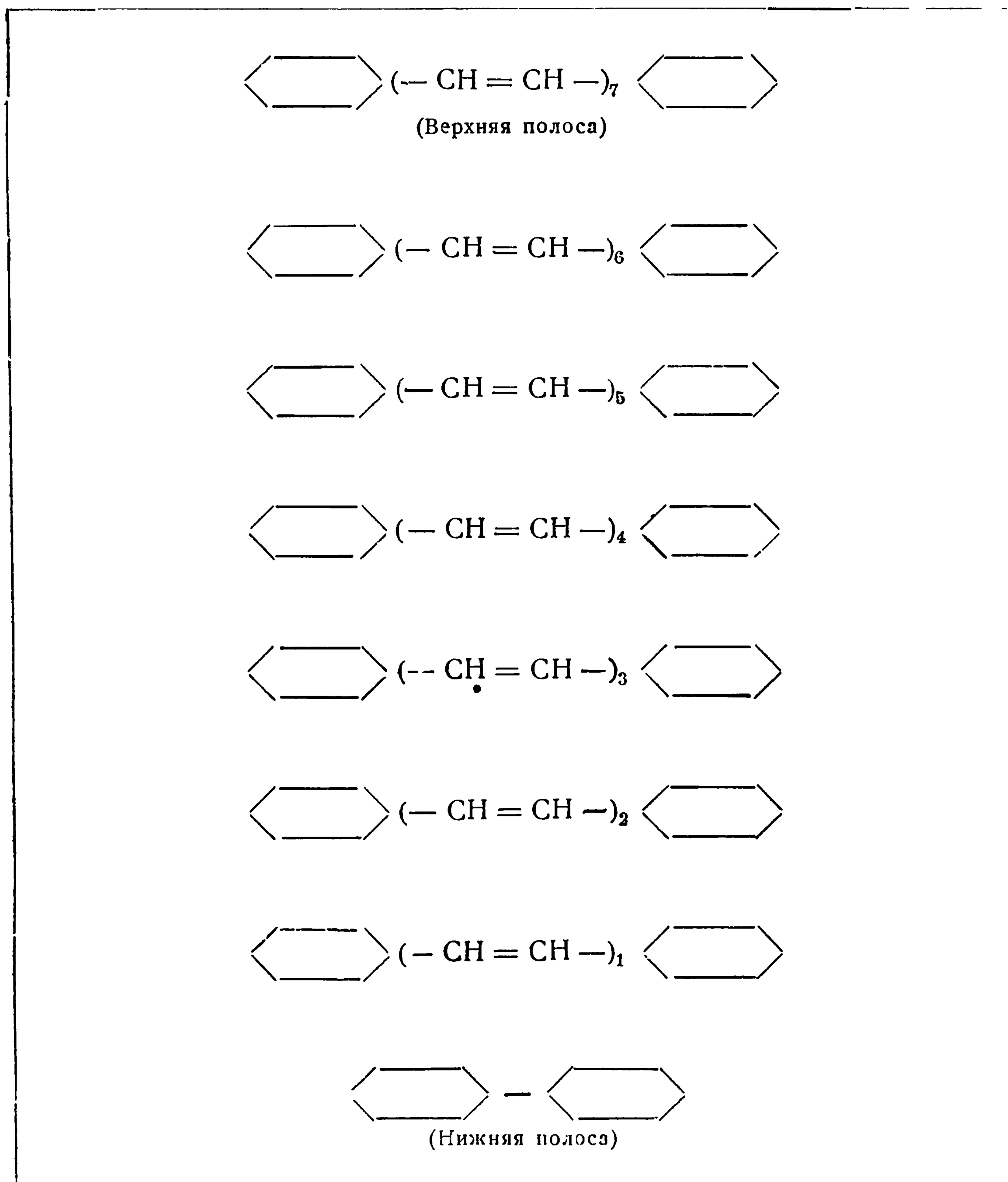
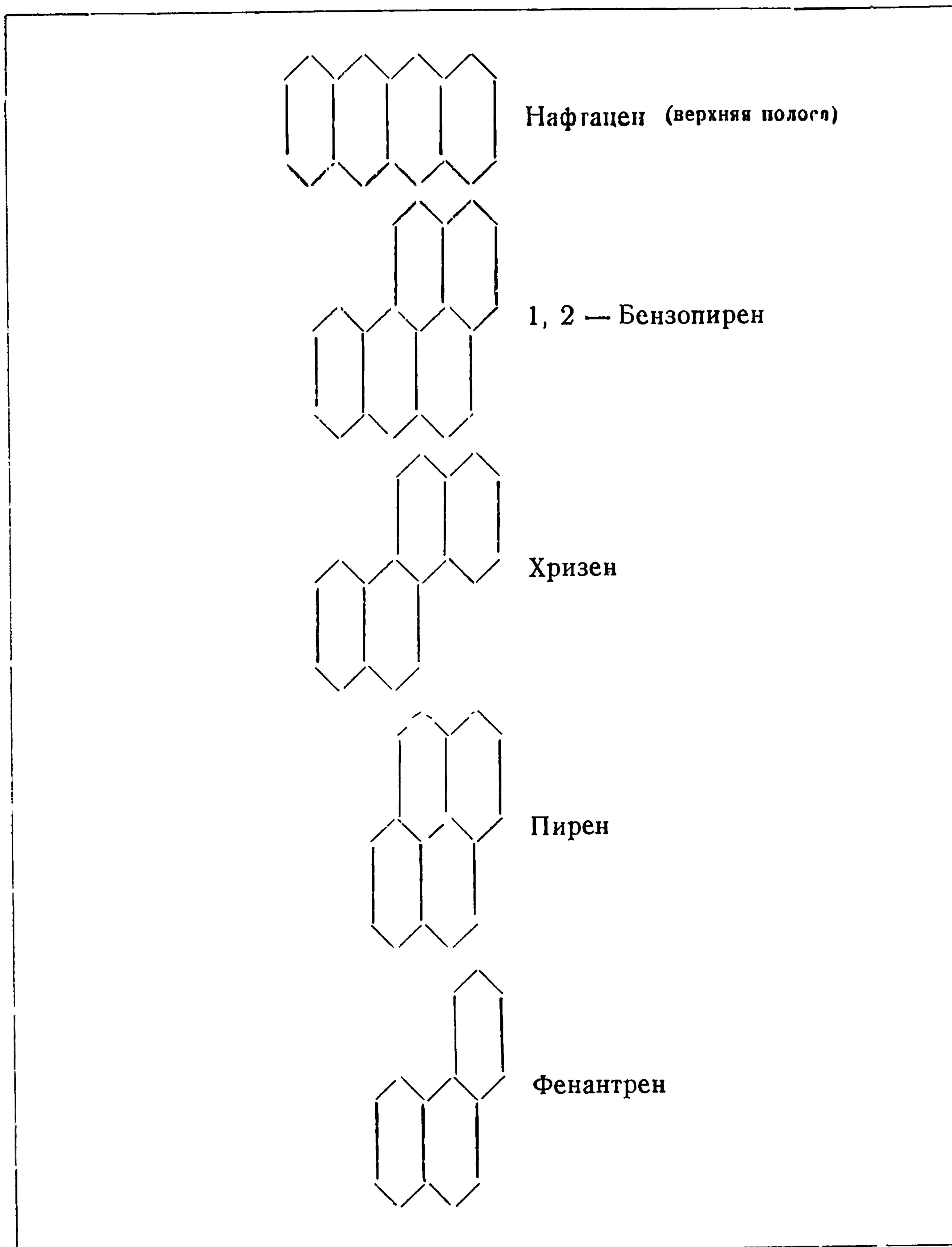


ТАБЛИЦА 4

Адсорбционный ряд некоторых полициклических соединений
(по Винтерштейну, 1934)



самые общие заключения все же могут быть сделаны. Например, если соединение адсорбируется ниже многих ненасыщенных углеводородов, то весьма вероятно, что оно является одним из более насыщенных соединений этого класса. Оно не может содержать сильно полярные группы, как гидроксил, карбоксил или аминогруппу. Наоборот соединения, адсорбирующиеся выше ненасыщенных соединений, обычно содержат сильно полярные группы.

7. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

1. Выбор аппаратуры, адсорбента и растворителя

Хотя, как указывалось выше, современная методика хроматографии окрашенных соединений мало чем отличается от метода, разработанного самим Цветом, все же за последние 12 лет работами многих десятков лабораторий всех стран были внесены ценные практические улучшения и создана новая большая область адсорбционного анализа — анализ неокрашенных соединений.[1]

Взамен очень простой аппаратуры, предложенной М. С. Цветом, в настоящее время имеется свыше 30 образцов различной аппаратуры, начиная от установок промышленного значения, кончая аппаратурой для микроанализа. Предусмотрены различные способы регулирования скорости протекания, подогревание колонки, в отдельных случаях проведение анализа без доступа кислорода и т. д. Для изготовления колонок применяется самый разнообразный материал, начиная от стекла и кварца, кончая сталью и фарфором.

[1] Возможность распространения метода на неокрашенные соединения была предусмотрена самим Цветом. Он называл ее „бесцветной" хроматографией.

Исключительное внимание было уделено поискам универсального адсорбента. Сам Цвет просмотрел около сотни различных адсорбентов, его последователи увеличили это число в несколько раз. В результате этих поисков можно формулировать свойства идеального адсорбента следующим образом. Идеальный адсорбент должен удерживать большие количества веществ, подлежащих разделению. Эти вещества должны передвигаться вдоль колонки под влиянием свежих порций растворителя (процесс проявления). Адсорбируемые вещества должны вымываться полностью полярными растворителями. Адсорбент не должен разлагать адсорбата и растворителя. Последний не должен растворять адсорбента. Размеры частиц адсорбента должны быть таковы, чтобы позволять быстрое и равномерное протекание раствора. Частицы адсорбента не должны быть пористыми, чтобы адсорбат не проникал глубоко внутрь. Адсорбент должен быть бесцветным.

Из обследованного различными авторами огромного количества органических и неорганических адсорбентов, только немногие употребляются для целей анализа. Окрашенные, окисляющие вещества и соединения с сильно кислыми и щелочными свойствами большею частью непригодны.[1] Наиболее распространенными адсорбентами являются окислы щелочно-земельных, гидроокиси и их соли, преимущественно углекислые и сернокислые. Для разделения неустойчивых органических соединений весьма пригодными оказались сахароза, лактоза, уголь и инулин.

Адсорбционные свойства веществ чрезвычайно зависят от способа приготовления. Многие широко распространенные адсорбенты, как-то: окись алюминия, окись магния, известь, изменяют свою адсорбционную способность в тысячи раз

[1] Следует отметить, что некоторые окрашенные вещества все же употребляются в качестве адсорбентов, так как они обладают высоким селективным действием для разделения родственных пигментов.

в зависимости от способа приготовления. Окись магния, например, может быть приготовлена в такой форме, что она разделяет все каротины, адсорбирующиеся на ней. Однако она может быть приготовлена и таким образом, что адсорбирующиеся каротины на ней почти не разделяются, и, наконец, можно получить такую окись магния, которая вообще не адсорбирует каротинов. Адсорбционные свойства окиси алюминия могут быть весьма повышены промыванием адсорбента известковой водой.

Ввиду больших вариаций адсорбционных свойств различных адсорбентов требуется большое искусство, чтобы изготовить адсорбент с заданными свойствами. Поэтому в последнее время большинство исследователей не изготовляют адсорбентов собственными силами, а пользуются адсорбентами, выпускаемыми в продажу различными фирмами. Эти адсорбенты отличаются весьма стандартными свойствами и, что очень существенно, имеют вполне определенные размеры зерен. [1]

Выбор растворителя для первоначальной адсорбции определяется в значительной степени растворимостью материала, активностью и растворимостью адсорбента. Сильнее всего растворенные вещества адсорбируются из неполярных и слабополярных растворителей: петролейного эфира, четыреххлористого углерода, циклогексана и т. д., слабее всего из воды, пиридина, органических кислот.

Проявление в принципе может быть достигнуто посредством промывания колонки с адсорбентом свежими порциями того же растворителя. Однако очень часто процесс проявления при таких условиях протекает столь медленно, что становится непрактичным проявлять тем же растворителем, который был применен для адсорбции. Поэтому, чтобы ускорить процесс, прибегают к помощи растворителей,

[1] Известно, что адсорбционная способность весьма зависит от размеров частиц адсорбента.

более легко вымывающих адсорбат. В известной степени здесь существует параллелизм между способностью к вымыванию адсорбата и полярностью. Очень важно, однако, чтобы применяемый для проявления растворитель не очень резко отличался по своей полярности от растворителя, примененного для адсорбции, иначе значительная часть адсорбента может быть вообще вымыта с колонки без того, чтобы реадсорбироваться снова в нижних слоях столба адсорбента.

2. Способы идентификации адсорбированных соединений

В первоначальном варианте метода локализация и идентификация вещества в основном производились по цветовым оттенкам. Это, очевидно, неприменимо к неокрашенным соединениям и не всегда дает исчерпывающий ответ в случае окрашенных, в силу того, что различие в оттенках может быть ничтожно. Поэтому в настоящее время широко применяется ряд дополнительных приемов, облегчающих идентификацию адсорбированных соединений. К числу таких способов принадлежат:

1) наблюдение в ультрафиолетовом свете;

2) эмпирическое деление колонки;

3) последовательное вымывание отдельных компонентов смеси;

4) применение цветных индикаторов;

5) образование окрашенных продуктов до и после адсорбции.

У л ь т р а х р о м а т о г р а ф и я. Под этим, очень неудачным, названием известно рассматривание хроматограммы в ультрафиолетовом свете, что дает возможность совершенно однозначной идентификации некоторых люминесцирующих веществ. Обычно хроматограммы рассматриваются в свете Вуда, т. е. при возбуждении флюоресценции длинноволновым ультрафиолетовым излучением ртутной лампы, однако

в отдельных случаях применяется более коротковолновая часть спектра ртутной лампы (фильтр—черное стекло Corex). В последнем случае стекло колонки обязательно заменяют кварцем.

Многие адсорбенты ярко флюоресцируют, и надо быть очень внимательным, чтобы не смешать их флюоресценцию с флюоресценцией адсорбата. Далее, флюоресценция характерна для сочетания адсорбат — адсорбент и может изменяться как по цвету, так и интенсивности при переходе к другому адсорбенту.

Так, бензантрон на окиси алюминия дает желтую флюоресценцию, на осветляющих землях — зеленую. В водных растворах цвет и интенсивность флюоресценции многих веществ сильно зависят от концентрации водородных ионов.

Наблюдение в свете люминесценции оказалось основным методом адсорбционного анализа бесцветных циклических углеводородов, в частности карциногенных, и является ценным дополнением при контроле технических продуктов и при очистке от примесей.

Эмпирическое рассечение колонки и последовательное вымывание отдельных компонентов смеси. Колонки, содержащие „хроматограмму“ из бесцветных соединений, адсорбированную и проявленную каким-то определенным способом, могут быть разделены на секции, из которых интересующее вещество может быть вымыто и определено соответствующими физическими, химическими или биологическими методами. Установив соотношение между положением на колонке и количеством адсорбированного материала, можно выполнить разделение почти так же точно, как и в случае окрашенных веществ.

Чтобы избежать требующей известного навыка операции выталкивания столба адсорбента и рассечения его на части, иногда прибегают к так называемой жидкой хроматограмме, т. е. к разделению смеси посредством продолжительного промывания колонки, на которой имеется хроматограмма.

Проходящий раствор собирается последовательными порциями и анализируется.

Цветные индикаторы. Этот весьма любопытный метод локализации бесцветных продуктов был впервые указан Цветом и получил практическое применение в работах Брокмана (1936, 1937). Чтобы определить, например, положение на колонке бесцветного, нефлюоресцирующего витамина D_3 при выделении его из жира рыбьей печени, Брокман предложил добавлять к экстракту из жира, содержащему витамин D_3, в качестве индикатора красный судан III. Этот краситель, как показал Брокман, образует зону, непосредственно примыкающую и перекрывающуюся узкой зоной витамина D_3. Пользуясь этим указанием, вырезают зону, содержащую судан и витамин, вымывают адсорбат и удаляют из раствора краситель.

В некоторых естественных смесях индикаторами неокрашенных соединений являются естественные пигменты, присутствующие в смеси. Так, при выделении бутофалина — главного действующего начала в яде жаб, оказалось, что бутофалину сопутствует характерный желтый пигмент, который образует зону, перекрывающуюся с зоной бутофалина.

Образование окрашенных продуктов до и после адсорбции. Превращение присутствующих в анализируемой смеси бесцветных соединений в окрашенные и последующее их выделение с помощью метода Цвета довольно широко применяются многими исследователями. Так, Стрэн показал, что неокрашенные карбонильные соединения могут быть превращены посредством сочетания с 2, 4-динитрофенилгидразином в желтые соединения. Последние легко разделяются на колонке из талька. Фенолы могут быть превращены в окрашенные соединения посредством реакции с хлористым железом, амины — с пикриновой кислотой. Стеролы и сахара образуют окрашенные соединения с азобензол-хлорид-р-карбоновой кислотой.

Другой способ обнаружения бесцветных соединений, который позволяет сохранить их неизменными, например для препаративных целей, заключается в том, что по ребру осторожно вытолкнутого на стекло или бумагу столба адсорбента проводят кисточкой, смазанной таким реактивом, чтобы реакция этого реактива с искомым веществом давала характерное окрашивание или флюоресценцию. Метод имеет тот существенный недостаток, что невозможно следить за проявлением. Поэтому, чтобы определить передвижение вещества по колонке с помощью этого метода и выработать стандартные условия проявления, надо анализировать на всех последовательных стадиях проявления.

Вместо смазывания вытолкнутого столба адсорбента можно образовать окрашенные зоны внутри самой колонки. Этот способ имеет особое значение при адсорбционном анализе неорганических соединений. Так, зоны, образуемые ионами некоторых металлов, могут быть сделаны видимыми обработкой колонок раствором сероводорода. В других случаях окрашенные соединения получаются за счет реакции металлических ионов с 8-гидроксихинолином. По предложению Шваба, этот способ называют проявлением хроматограммы. Таким образом, термин „проявление“ в хроматографии, к сожалению, употребляется для обозначения двух совершенно различных операций: для разделения зон посредством промывания соответствующим растворителем и для обнаружения зон, образуемых бесцветными продуктами

8. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Хроматографический анализ не является исключительным уделом органической химии. В самые последние годы начала зарождаться новая многообещающая область — хроматография неорганических соединений.

Так, в 1939 г. Эрленмейер и Дан показали, что водные растворы целого ряда катионов легко разделяются на колонках из 8-оксихинолина или на колонках, образованных из этого реагента и неадсорбирующего кремнезема. Так как в этом случае происходит не только адсорбция, но и обратимая химическая реакция и многие ионы образуют окрашенные соединения с 8-гидроксихинолином, то исследуемые соединения легко обнаруживаются, даже если они присутствуют в ничтожных количествах. Ниже приводим порядок,[1] в котором располагаются зоны, образуемые отдельными ионами, и цвет этих зон:

VO_3' — серовато-черный
WO_4'' — желтый
$Cu^{\cdot\cdot}$ — зеленый
$Bi^{\cdot\cdot\cdot}$ — желтый
$Ni^{\cdot\cdot}$ — зеленый

$Co^{\cdot\cdot}$ — красноватый
$Zn^{\cdot\cdot}$ — желтый
$Fe^{\cdot\cdot\cdot}$ — черный
$UO_2^{\cdot\cdot}$ — красно-оранжевый

Если адсорбция производится из водного раствора уксусной кислоты, полосы цинка и железа обмениваются местами. В отдельных случаях для лучшего разделения рекомендуется проявление водным раствором уксусной кислоты (разделение Ni и Co). Метод очень чувствителен: с его помощью можно открыть 2 микрограмма железа.

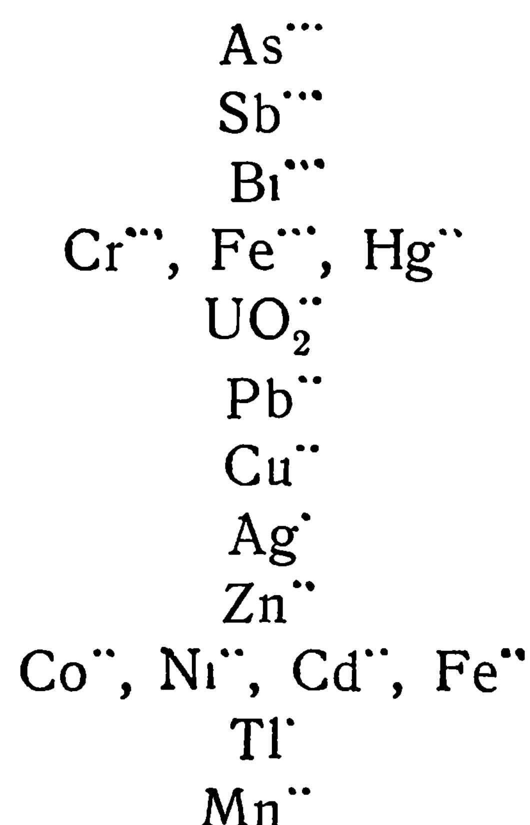
Другое направление хроматографии неорганических соединений было указано Швабом и его сотрудниками (1937—1940). Они разработали метод, пригодный для анализа целого ряда катионов и анионов. В качестве адсорбента ими была применена „стандартизованная по Брокману“ окись алюминия (фирма Merck).

Процесс проявления обычно состоит из двух операций. Во-первых, значительное разделение зон достигается посредством промывания водой или разбавленной кислотой. Однако

[1] Начиная с верхнего конца колонки.

здесь не всегда происходит полное разделение. Поэтому прибегают ко второй процедуре — промыванию колонки специальным проявителем, который окрашивает зоны и усиливает их разделение. В качестве проявителя берут: чистый аммиак и аммиак, насыщенный H_2S, $K_4Fe(CN)$, или NaOH.

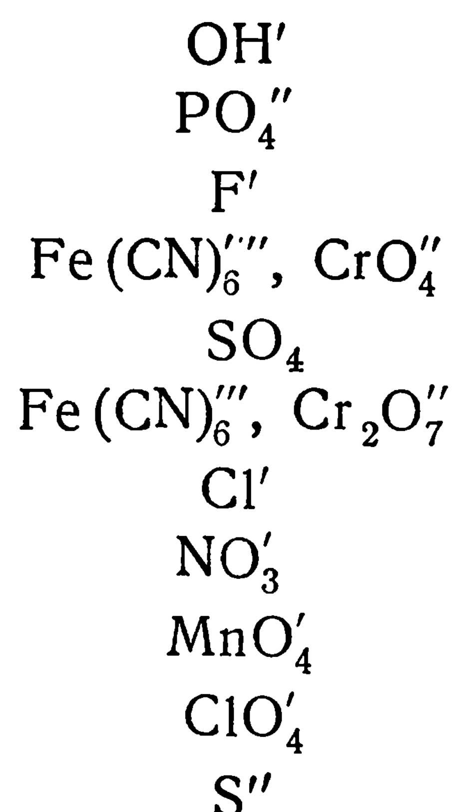
При адсорбции из водных растворов катионы располагаются на окиси алюминия[1] в следующем порядке:



[1] Вопрос о том, в какой форме ион адсорбируется на окиси алюминия, до сих пор не решен. Наиболее распространена точка зрения, что щелочной адсорбент (pH — окиси алюминия 9.4) нейтрализует кислый раствор вследствие чего концентрация водородных ионов вдоль столба непрерывно изменяется и при прохождении каждой новой ступени pH осаждается тот элемент, гидроокись которого достигает величины произведения растворимости. Самую верхнюю зону, действительно, занимают ионы водорода, однако порядок выделения многих элементов, например меди и серебра, не соответствует величинам их растворимости. Они должны были бы находиться над всеми другими элементами, а $Tl(OH)_3$, как растворимая гидроокись, вообще не должна адсорбироваться. Необходимость более сложного объяснения показывают и опыты Шваба, обнаружившего, что хорошая адсорбция окиси алюминия обязана присутствию следов иона натрия. Чистая окись алюминия, имеющая к тому же pH меньше 9.4, адсорбирует очень плохо.

Элементы, стоящие в одной строке, не разделяются и образуют смешанные зоны. Этот ряд не зависит от анионов, по крайней мере, для важнейших из них—NO_3', SO_4'', Cl' и PO_4'''. Сами анионы при этом оказываются в растгоре (рис. 5).

Однако их тоже можно подвергнуть хроматографическому анализу, если предварительно обработать адсорбент кислотой.[1] Шваб и Датлер получили следующий адсорбционный ряд (сверху вниз):



OH'

PO_4''

F'

$Fe(CN)_6''''$, CrO_4''

SO_4

$Fe(CN)_6'''$, Cr_2O_7''

Cl'

NO_3'

MnO_4'

ClO_4'

S''

При изготовлении хроматограмм органических соединений имеются довольно широкие возможности влиять на адсорбционные свойства исследуемых соединений посредством изменения растворителя и проявителя. В анализе неорганических соединений это невозможно, так как приходится ограничиваться водными растворами. Однако, как показал Шваб и его ученики, здесь имеются другие, повидимому не менее широкие, возможности — применять комплексообразование. Если прибавить к исследуемому водному раствору комплексообразователи, то нормальный адсорбци-

[1] Для этого через колонку пропускают 1-N раствор HNO_3, $HClO_4$ или HCl и затем промывают водой.

онный ряд, полученный для водных растворов, искажается, катионы, образовавшие комплексный анион, адсорбируются хуже и опускаются ниже в адсорбционном ряду. В аммиачном растворе, например, получается следующий ряд:

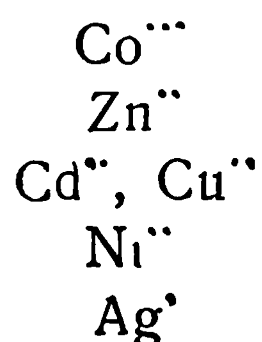
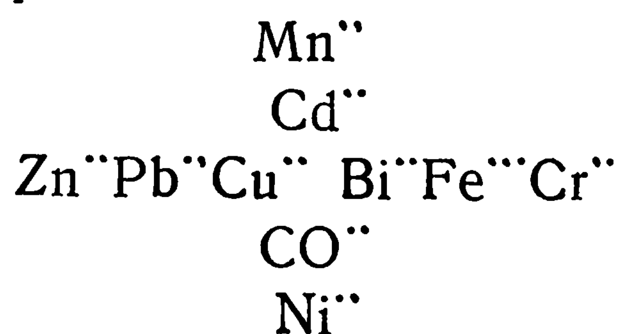

$Co^{\cdot\cdot\cdot}$
$Zn^{\cdot\cdot}$
$Cd^{\cdot\cdot}$, $Cu^{\cdot\cdot}$
$Ni^{\cdot\cdot}$
$Ag^{\cdot}$



Рис. 5. Разделение неорганических катионов на колонки окиси алюминия.
a — азотнокислое железо, свинец, серебро: верхняя коричневая зона — железо, средняя сероватая — свинец, нижняя черная—серебро, проявитель — NaOH; *b* — азотнокислое железо, медь и серебро: верхняя—красно-коричневая (Fe), средняя—голубая (Cu), нижняя — голубовато-сероватая (Ag) (проявитель — NaOH, адсорбент не подвергался действию света); *c* — азотнокислое железо, медь и кобальт: верхняя—темноголубая (Fe), средняя — кирпично-красная (Cu), нижняя — зеленовато-серая (Co) [проявитель — $K_4Fe(CN_6)$] (по Цехмейстеру и Чолноки).

Из сравнения этого ряда с адсорбционным рядом из водных растворов видно, что адсорбция из раствора аммиака позволяет разделить CO — Ni, CO — Cd, Cd — N, неразделимые при адсорбции из воды.

Новые возможности разделения дает адсорбция из виннокислых растворов. Здесь устанавливается следующий ряд:


$Mn^{\cdot\cdot}$
$Cd^{\cdot\cdot}$
$Zn^{\cdot\cdot}Pb^{\cdot\cdot}Cu^{\cdot\cdot}$ $Bi^{\cdot\cdot}Fe^{\cdot\cdot\cdot}Cr^{\cdot\cdot}$
$CO^{\cdot\cdot}$
$Ni^{\cdot\cdot}$

Одной из хороших иллюстраций изумительной способности адсорбционного метода к разделению родственных соединений может служить разделение изотопов лития,

калия и азота. Это явление впервые было обнаружено Тейлером и Уреи. Проведя серию опытов с раствором хлористого лития, они показали, что, в то время как в первоначальном растворе отношение Li^7 и Li^6 равно 12.6, в прошедшем растворе оно равно 8.9. Аналогичные опыты были произведены с хлористым калием. Здесь оказалось, что в прошедшем через колонку растворе преобладает K^{41}, т. е. изотоп K^{39} адсорбируется лучше. В случае хлористого аммония предпочтительно адсорбируется тяжелый изотоп.

Хроматография неорганических соединений сделала только самые первые шаги. Высокая чувствительность метода, который уже сейчас позволяет открывать в растворе 1 μg меди или железа, дает возможность надеяться, что методу принадлежит большое будущее и при анализе неорганических соединений.

Наш обзор охватывает лишь основные применения хроматографического анализа, здесь не рассматривается ряд новых, еще недостаточно широко испытанных, приемов анализа, например сочетание адсорбционного разделения с электрофоретическим (Strain, 1939), применение радиоактивных индикаторов, упрощенный микрометод и др.

Мы совершенно не касались теории хроматографического анализа, хотя в последние годы были сделаны небезуспешные попытки (Wilson, 1940) создать теорию этого сложного динамического процесса для двухкомпонентных смесей.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

О ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМ АДСОРБЦИОННОМ АНАЛИЗЕ

I. СВОДКИ И МОНОГРАФИИ

Cook A. Chromatographic analysis. London, 1941.

Dhéré Ch. La fluorescence en biochimie. Paris, 1937.

Morton R. A. The application of adsorption spectra to the study of vitamins, hormones and coenzymes. 2 ed. 1942.

Palmer L. S. Carotenoids and related pigments. New York, 1922.

Strain H. H. Chromatographic adsorption analysis. New York. 1942.

Willstädt H. L'analyse chromatographique et ses applications. Paris. 1939.

Zechmeister L. a. Cholnoky L. Principles and practice of chromatography. New York, 1943.

II. СПЕЦИАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

Ардашев Б. И., Промышл. органич. химии, 1, 353, 1936.

Arnold R. T. J. Am. Chem. Soc., *61*, 1611, 1939.

Becker E. u. Schöpf Cl. Ann. d. Chemie, *524*, 49, 124, 1936.

Brockmann H. Z. physiol. Chemie, *241*, 104, 1936.

Букин В. Н. и Мурри И. К. Бюлл. прикл. химии, серия III, № 11, 27, 1935.

Dhéré Ch. et G. Vegezzi, C. R. 399, 1916.

Dhéré Ch. J. physiol. pathol, gen., 67, 1917.

Drummond J. S., Singer E. a. Mac Walter. R. J. Biochem. J., *29*, 456, 1935.

Erlenmeyer H. u. Bahn H. Helv. chim. acta, *22*, 1369, 1939.

Grafe, V. Handb. d. bioch. Arbeitsmethoden v. E. Abderhalden. B. VI, S. 100—102, 1912.

Henderson G. a. Rule H. Nature, *141*, 917, 1938.
Karrer P. Helv. chim. acta, *22*, 1149, 1939.
Козлов И. К. Пробл. пит., *7*, 26, 1938.
Koshara W. Z. physiol. Chem., *240*, 127, 1936.
Kuhn R. u. Winterstein A., Helv. chim. acta, *11*, 87, 116, 123, 144, 1928.
Kuhn R. u. Lederer E. Ber. Deutsch. chem. Ges., *64*, 1349, 1931.
Kuhn R., Winterstein A. u. Lederer E. Z. physiol. Chem. *197*, 141 1931.
Kuhn R. u. Grundmann G. Ber. Deutsch. chem. Ges., *66*, 146, 1933.
Makkinney G. J. Biol. chem., *230*, *132*, 91, 1940.
O'L. Crow M. a. A. Walker. J. opt. soc. Am., *34*, 135, 1944.
Николаев В. Н. и Руденко, Е. Н. ДАН, *21*, 237, 1938.
Palmer L. S. a. C. H. Eckles. J. biol. Chem., *17*, 191, 211, 233, 237, 245, 1914.
Rogowski W. Diss. Freibourg, 1912.
Розум И. С. и Уразовский, С. С. Биохимия, *5*, 393, 1940.
Ruggli P. a. Jensen P. Helv. chim. acta, *18*, 624, 1935.
Schwabb, G. M. u. Mitarb., Ang. Chem., *50*, 546, 691, 1937; *51*, 709, 1938; *52*, 606, 1939; *53*, 39, 1940.
Strain H. H. J. Am. Chem. Soc., *61*, 1293, 1939.
Taylor T. J. a. H. C. Urey. J. chem. physics, *5*, 597, 1937. 6, 429, 1938.
Троицкий Г. В. Биохимия *5*, 375, 1940.
Wagner-Jauregg T. Z. physiol. Chemie, *247*, 135, 1937.
Wilson J. N. J. Am. Chem. Soc., *62*, 1583, 1940.
Winterstein A. u. Stein G. Z. physiol. Chemie, *220*, 263, 1934.
Winterstein A. u. Schön K. Z. physiol. Chemie, *230*, 139, 1934.
Winterstein A. u. Mittarb. Z. physiol, Chemie, *230*, 146, 158, 1934.
Willstätter R. u. M. Isler. Ann. *390*, 269, 1912.
Willstätter R. u. Stoll. Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin, 1913.
Zscheile E. P. Bot. gaz., *95*, 529, 1934.

СОДЕРЖАНИЕ



М. С. ЦВЕТ

О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу. (1903) 9

Физико-химические исследования хлорофилла. Адсорбции (1906) 30

Адсорбционный анализ и хроматографический метод. Применение к химии хлорофилла (1906) 41

Хромофиллы в растительном и животном мире (1910) 54

ПРИЛОЖЕНИЯ

А. А. Рихтер и Т. А. Красносельская. Роль М. С. Цвета в создании хроматографического адсорбционного анализа 215

М. С. Цвет. Краткая биография 229

Список опубликованных работ М. С. Цвета 232

Б. Я. Свешников. Современное состояние хроматографического анализа 236

Литература о хроматографическом адсорбционном анализе 271

М.М. Цвет.

М. С. ЦВЕТ — ХИМИЯ ХЛОРОФИЛЛА
И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АДСОРБЦИОННЫЙ
АНАЛИЗ

*

*Печатается по постановлению
Редакционно-издательского совета
Академии Наук СССР*

*

Технический редактор *О. Залышкина*
Корректор *И. Ш. Мароз*
Художественное оформление книги *Н. М. Лобанова*

*

РИСО АН СССР № 2261. А-00264. Издат. № 537.
Тип. заказ № 3799. Подп. к печати 8/IV 1946 г.
Формат бумаги $70 \times 92^1/_{16}$. Печатн. л. $17^1/_4$. + 2 вкл,
Уч.-издат. — 13,5. Тираж 5000

Тип. им. Володарского, Управления полиграфии
и издательств при Ленгорисполкоме


ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
М. С. ЦВЕТ

